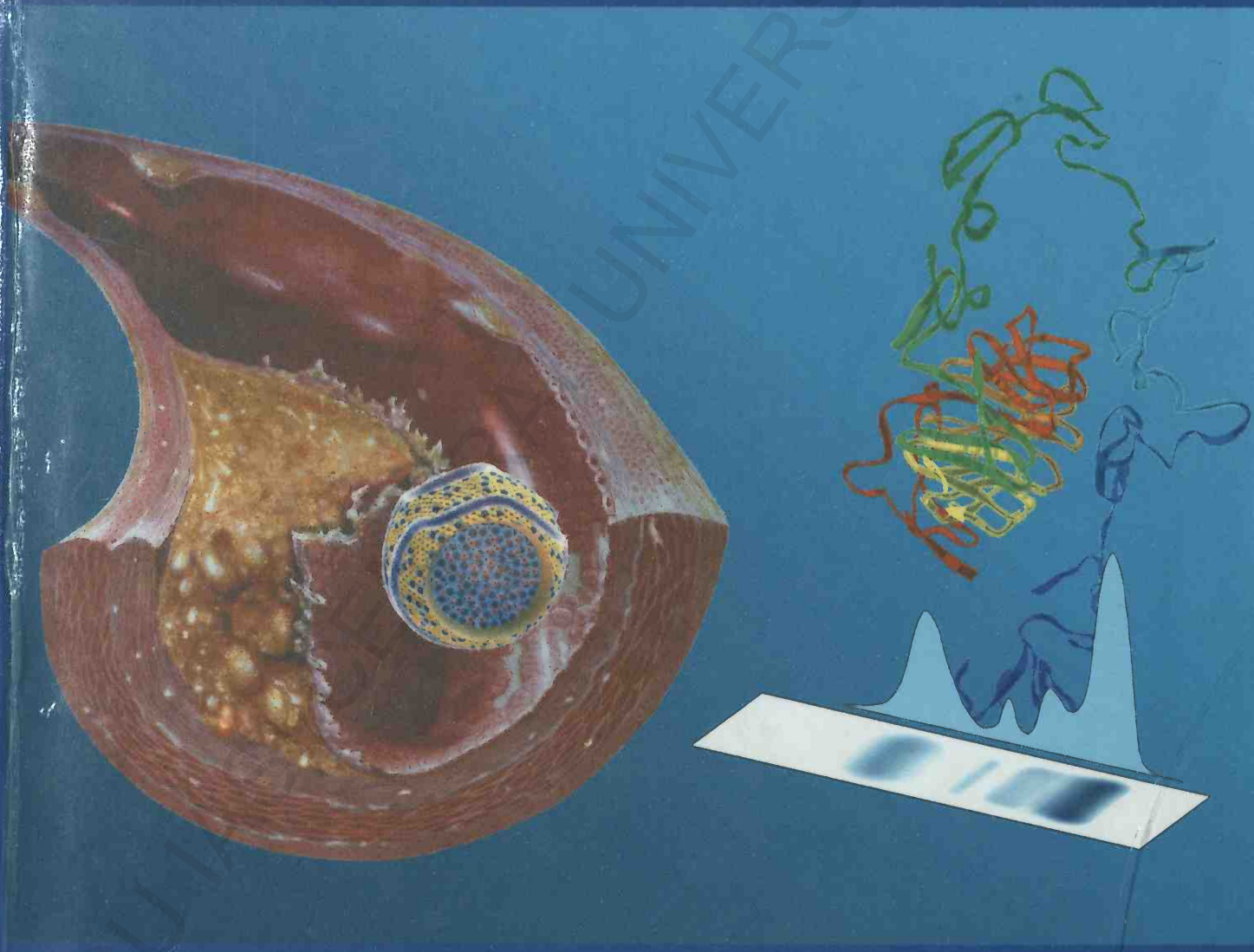
Biochimie clinică

Implicaţii practice

Ediţia a II-a

Minodora Dobreanu



+CD
IV 81.569

UNIVERSITY LIBRARY

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
IV 81. 569

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Familiei mele, pentru sprijinul și încurajarea permanente.
Minodora Dobreanu

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Minodora Dobreanu

605317

Biochimie clinică

Implicaţii practice

Ediţia a II-a

478448
B.C.U. IAŞI

ALE

EDITURA MEDICALĂ
2010

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biochimie clinică. Implicații practice. Ediția a II-a
Sub redacția Minodora Dobreanu

ISBN 978-973-39-0698-8

CIP nr. 10582 / 23.05.2010

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
DOBREANU, MINODORA
Biochimie clinică: implicații practice / Dobreanu Minodora. – București: Editura Medicală, 2010
ISBN 978-973-39-0698-8

577.1

Referenți:

Prof. Univ. Dr. Eugen Carasevici, UMF „Gr. T. Popa", Iași
Prof. Univ. Dr. Maria Greabu, UMF „Carol Davila", București
Prof. Univ. Dr. Marius Sabău, UMF Tîrgu Mureș
Prof. Univ. Dr. Angela Borda, UMF Tărgu Mureș

Coperta I:
Structura plăcii de aterom la nivelul peretelui arterial și a lipoproteinei cu densitate mică – LDL.
Modelul structural computerizat al receptorului pentru LDL.
Traseu de separare electroforetică a lipoproteinelor plasmatice și interpretarea densitometrică a acestuia.

Tehnoredactare computerizată:
Dr. Liviu Sorin Enache,
Dr. Elena Luminița Enache

Grafică:
Dr. Zoltán Sárkány

Copyright:
Toate drepturile editoriale aparțin în exclusivitate autorilor, publicația fiind protejată integral de legislația internă și internațională. Orice valorificare a conținutului, integral sau parțial (traducere, multiplicare etc.), fără permisiunea scrisă a autorilor, se pedepsește conform legislației în vigoare.

1 9. APR. 2011

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Autorii
în ordine alfabetică:

Conf. Univ. Dr. Ioana Brudaşcă, UMF Iuliu Haţieganu

Prof. Univ. Dr. Mircea Cucuianu

Prof. Univ. Dr. Dan Dobreanu, UMF Tîrgu Mureş

Prof. Univ. Dr. Minodora Dobreanu, UMF Tîrgu Mureş

Drd. Elena Luminiţa Enache, UMF Tîrgu Mureş

Drd. Liviu Sorin Enache, UMF Tîrgu Mureş

As. Univ. Dr. Márta Andrea Fodor, UMF Tîrgu Mureş

Drd. Annamaria Földes, UMF Tîrgu Mureş

Dr. Chim. Ileana Funduc

Dr. Chim. Sorin Gîju, Spitalul Judeţean de Urgenţă Timişoara

Prof. Univ. Dr. Ştefan Hobai, UMF Tîrgu Mureş

Dr. Alina Mărginean, medic rezident medicină de laborator

Şef lucrări Enikö Nemes-Nagy, UMF Tîrgu Mureş

Prof. Univ. Dr. Octavian Popescu, Profesor la Facultatea de Psihologie şi Ştiinţe ale Educatiei UBB Cluj, Director al Centrului de Biologie Moleculară UBB Cluj, Director ştiinţific al Institutului de Biologie al Academiei Române Bucureşti, Membru titular al Academiei Române, Visiting professor la Universitatea din Basel.

Prep. Univ. Dr. Alina Scridon, UMF Tîrgu Mureş

Conf. Univ. Dr. Didona Ungureanu, UMF „Gr.T. Popa" Iaşi

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Cuprins vii
Introducere la Ediția a II-a xi
Capitolul 1. Aspecte moleculare ale vieții. Compoziția chimică și organizarea materiei vii 1
Minodora Dobreanu
1.1 Compoziția elementară 1
1.2 Constituenții fundamentali 1
1.3 Organismul viu ca sistem organizat 3
1.4 Aspecte moleculare ale vieții: spațiu, timp, energie 3
Capitolul 2. Echilibrul hidro-electrolitic 5
Minodora Dobreanu
2.1 Apa și viața 5
2.2 Distribuția apei și electroliților în organism 5
2.3 Proprietățile apei 7
2.4 Schimburile hidrodinamice. Forțele care coordonează mișcarea apei și electroliților între compartimente 7
2.5 Homeostazia sodiului și apei 10
2.6 Tulburări ale metabolismului apei și sodiului 16
2.7 Homeostazia potasiului 18
2.8 Homeostazia hidro-electrolitică a pacientului chirurgical 20
2.9 Prezentări de caz 20
Bibliografie selectivă 22
Capitolul 3. Homeostazia calciului, fosforului și magneziului 23
Minodora Dobreanu
3.1 Homeostazia calciului 23
3.2 Mecanisme implicate în homeostazia fosfo-calcică 24
3.3 Tulburările metabolismului calciului și fosfatului 26
3.4 Investigarea tulburărilor metabolismului fosfo-calcic 29
3.5 Afecțiuni osoase metabolice 29
3.6 Homeostazia magneziului 30
3.7 Prezentări de caz 31
Bibliografie selectivă 32
Capitolul 4. Echilibrul acido-bazic al organismului 33
Minodora Dobreanu
4.1 Mecanisme implicate în homeostazia acido-bazică 33
4.2 Variații fiziologice și patologice ale parametrilor echilibrului acido-bazic 39
4.3 Potasemia și echilibrul acido-bazic 41
4.4 Prezentări de caz 42
Bibliografie selectivă 43

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 5. Hemoproteine şi metabolismul fierului.....45
Enikö Nemes- Nagy
5.1 Hemoglobina şi mioglobina.....45
5.2 Metabolismul fierului.....58
5.3 Degradarea hemului. Ictere.....62
5.4 Incompatibilitatea de Rh şi de grupă ABO.....64
5.5 Prezentări de caz.....65
Bibliografie selectivă.....67
Capitolul 6. Vitaminele şi importanţa lor medicală.....69
Elena Luminiţa Enache, Minodora Dobreanu
6.1 Vitaminele hidrosolubile.....70
6.2 Vitaminele liposolubile.....82
6.3 Prezentări de caz.....90
Bibliografie selectivă.....91
Capitolul 7. Metabolismul carbohidraţilor.....93
Minodora Dobreanu
7.1 Sursele de carbohidraţi.....95
7.2 Utilizarea glucozei de către celulele organismului.....102
7.3 Mecanismele de reglare ale metabolismului.....106
7.4 Diabetul zaharat.....112
7.5 Prezentări de caz.....118
Bibliografie selectivă.....119
Capitolul 8. Metabolismul lipidelor/ lipoproteinelor şi ateroscleroza.....121
Minodora Dobreanu
8.1 Lipidele.....121
8.2 Lipoproteinele.....123
8.3 Metabolismul lipidelor / lipoproteinelor.....127
8.4 Tulburări ale metabolismului lipidic - Dislipidemiile.....134
8.5 Factorii de risc aterogen - Ateroscleroza.....138
8.6 Considerente privind tratamentul dislipidemiilor.....144
8.7 Prezentări de caz.....149
Bibiografie selectivă.....150
Capitolul 9. Aminoacizii: structură, clasificare, metabolism.....153
Didona Ungureanu
9.1 Structură.....153
9.2 Proprietăţi acido-bazice ale aminoacizilor.....153
9.3 Peptidele.....156
9.4 Metabolismul aminoacizilor.....157
Bibliografie selectivă.....177
Capitolul 10. Proteine – structură, funcţii şi metabolism. Proteinele plasmatice.....179
Minodora Dobreanu
10.1 Structura proteinelor.....179
10.2 Proprietăţile generale ale proteinelor.....181
10.3 Clasificarea proteinelor.....182
10.4 Proteinele plasmatice.....183
10.5 Cazuri clinice comentate.....198
Bibliografie selectivă.....200
Capitolul 11. Metode de separare şi caracterizare a proteinelor.....201
Ileana Funduc
11.1 Electroforeza.....201

BCU "IOAN SLAVICI" LIBRARY

11.2 Cromatografia....209
11.3 Metode imunologice....215
Bibliografie....221

Capitolul 12. Concepte de bază în interpretarea variațiilor patologice ale enzimelor serice....223
Mircea Cucuianu, Ioana Brudaşcă
12.1. Date generale privind enzimele....223
12.2. Activitatea enzimatică în celulele vii....232
12.3. Bazele fiziopatologice ale diagnosticului enzimatic....240
12.4. Valoarea diagnostică a determinărilor de enzime....242
Bibliografie selectivă....256

Capitolul 13. Biochimia, fiziologia şi patologia hemostazei....259
Ioana Brudaşcă
13.1 Hemostaza – noțiuni introductive....259
13.2 Hemostaza primară....260
13.3 Coagularea....269
13.4 Mecanisme anticoagulante fiziologice....276
13.7 Fibrinoliza....280
13.8 Particularități ale hemostazei în diferite stări fiziologice şi patologice....283
13.9 Trombozele....287
Bibliografie selectivă....290

Capitolul 14. Receptorii celulari şi mecanismele de transducție a semnalului....291
Scridon Alina
14.1 Receptorii celulari....292
14.2 Mecanisme semnal receptor-independente....302
14.3 Mesagerii secunzi....303
14.4 Concluzii....318
Bibliografie selectivă....318

Capitolul 15. Hormonii hipofizari şi tiroidieni....321
Elena Luminița Enache
15.1 Hormonii hipofizari....321
15.2 Hipofiza posterioară....341
15.3 Hormonii tiroidieni....349
15.4 Bibliografie selectivă....357

Capitolul 16. Considerente practice în determinarea în laborator a hormonilor....359
Liviu Sorin Enache, Elena Luminița Enache
16.1 Introducere....359
16.2 Tehnici de laborator utilizate în diagnosticul bolilor endocrine....362
16.3 Tipuri de produse biologice utilizate pentru dozări hormonale....367
Bibliografie selectivă....367

Capitolul 17. ADN – organizare, replicare şi reparare....369
Ştefan Hobai, Octavian Popescu
17.1 Organizarea structurală a ADN....369
17.2 Replicarea ADN....385
17.3 Repararea ADN....392
Bibliografie selectată....396

Capitolul 18. ARN – transcriere, prelucrare şi reglarea exprimării genice....397
Ştefan Hobai, Octavian Popescu
18.1 Transcrierea ADN....397
18.2 Prelucrarea transcriptelor primare....405
18.3 Reglarea exprimării genelor....410

BCU "IULIA HAȘDEU" UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie selectată....418
Capitolul 19. Aspecte paraclinice şi metabolice în proliferările maligne....421
Minodora Dobreanu, Alina Mărginean
19.1 Introducere....421
19.2 Transformări metabolice în celulele maligne....423
19.3 Diagnosticul precoce al proliferărilor maligne....424
19.4. Peptide non-hormonale ca şi indicatori de malignitate - markeri tumorali....426
19.5 Sistemul endocrin difuz....436
19.6 Tumori non- endocrine producătoare de hormoni....439
19.7 Enzime şi izoenzime....442
19.8 Proteine serice speciale....444
19.9 Determinarea markerilor tumorali....446
19.10 Evaluarea clinică....450
19.11. Recomandări pentru utilizarea markerilor tumorali....451
19.12 Proteomica. Un nou nivel de înţelegere a malignităţii....453
Bibliografie selectivă....456
Capitolul 20. Patochimia funcţiilor renale....459
Minodora Dobreanu, Annamaria Földes, Sorin Gîju
20.1 Elemente de structură renală....459
20.2 Metabolismul renal....463
20.3 Funcţiile renale....464
20.4. Explorarea de laborator a funcţiilor renale....467
20.5 Sindroame nefrologice....478
Bibliografie selectivă....483
Capitolul 21. Patochimia funcţiilor hepatice....485
Andrea Marta Fodor
21.1 Elemente structurale şi funcţionale....485
21.2 Explorarea de laborator a funcţiilor hepatice....490
21.3 Patochimia icterelor....493
21.4 Prezentări de caz....500
Bibliografie selectivă....501
Capitolul 22. Patochimia tubului digestiv....503
Liviu Sorin Enache, Minodora Dobreanu
22.1 Funcţiile digestive ale cavităţii bucale şi esofagului....503
22.2 Patochimia şi explorarea de laborator a funcţiilor gastrice....504
22.3 Patochimia şi explorarea de laborator a digestiei şi absorbţiei intestinale....508
22.4 Explorarea de laborator a funcţiilor pancreatice exocrine....516
Bibliografie selectivă....523
Capitolul 23. Biochimia inimii....525
Dan Dobreanu
23.1 Biochimia contracţiei miocardice....525
23.2 Metabolismul miocardic....531
Bibliografie selectivă....539
Anexa 1. Abrevieri....541
Anexa 2. O cronologie a biochimiei....545
Anexa 3. Valorile normale şi limitele de decizie clinică ale testelor de laborator....549
Anexa 4. Index de subiecte....555

BCU "VASILE GOLDIŞ" ARAD UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE LA EDIȚIA A II-A

În ultimii patru ani care au trecut de la prima ediție a cărții de față, am fost martorii unei adevărate explozii informaționale în științele biomedicale: descoperirea unor tehnologii tot mai puternice a pus bazele unor noi domenii cum ar fi proteomica, metabolomica, bioinformatica medicală, care permit un diagnostic de mare precizie și finețe.

Intenția acestei a II-a ediții a cărții ***Biochimie Clinică – implicații practice*** *este de a aduce la zi și consolida informațiile prezentate în prima ediție, prin completarea cu o serie de capitole noi, recent introduse în tematica de pregătire a medicilor specialiști în medicina de laborator din România.*

Fără a avea pretenția că abordarea este exhaustivă, considerăm lucrarea de față o bună introducere pentru cei care doresc să dobândească cunoștințe de biochimie clinică. Lucrarea oferă o paletă complexă de informații actuale în domeniu, cu aportul unor specialiști de renume. Inițial concepută ca manual-curs de referință pentru studenții Facultății de Medicină a Universității de Medicină și Farmacie Târgu Mureș (2005), la prima ediție cartea a suferit modificări substanțiale de la textul inițial, pentru ca în forma actuală să încununeze efortul a patru colective de la trei universități (UMF Târgu Mureș, UMF „Iuliu Hațieganu" Cluj Napoca și UMF „Grigore T. Popa" Iași) și o asociație profesională (ALMR – Asociația Laboratoarelor Medicale din România) reunite cu scopul de a pune bazele unei cărți de referință în domeniu.

Din sala de curs în laboratorul de analize medicale, veți primi date care să vă asigure cunoștințe teoretice solide, aplicabile în practică. Explicațiile clare și maniera prietenoasă de prezentare a informației științifice (fără exces de formule chimice), vor face din această lucrare un material de bază pentru specialiștii din laboratorul de analize medicale.

Imaginile, ilustrațiile, reprezentările grafice și tabelele numeroase și de o foarte bună calitate, întregesc textul și îl susțin cu succes .

Noutăți în această ediție:

- *Capitole noi – Hemoproteine și metabolismul hemului, Aminoacizii (structură, clasificare, metabolism), Metode de explorare în laborator a proteinelor, Receptorii celulari și mecanismele de transducție a semnalului, Hormonii hipofizari și tiroidieni, Considerente practice în determinarea de laborator a hormonilor, ADN (organizare, replicare și reparare), ARN (transcriere, prelucrare și reglarea exprimării genice);*
- *Prezentările de caz – vor fi utile tinerilor specialiști și rezidenților în procesul de instruire.*

Adresăm mulțumirile noastre colegilor care au participat cu experiența lor profesională și comentarii pertinente la îmbunătățirea aspectului și a conținutului materialului.

Comentarii ale specialiștilor, celor implicați în activitatea educațională, dar și ale studenților, sunt binevenite pe adresa dobreanum@yahoo.com.

Minodora Dobreanu

31 mai 2010

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 1.
Aspecte moleculare ale vieții.
Compoziția chimică și organizarea materiei vii

Minodora Dobreanu

1.1 Compoziția elementară

Organismele vii sunt alcătuite din elemente comune sistemelor anorganice, care vor fi numite bioelemente (elemente biogene). Compoziția organismelor vii este o oglindă a mediului înconjurător, între cele două existând schimburi de substanță, energie și informație alcătuind așa numitele cicluri ale elementelor (C, N, Fe etc).

Elementele constituente:

- macroelemente (până la 99% din organismele vii): O, C, H, N, P, Ca;
- oligoelemente (0,05-1% din organismele vii): Na, K, Cl, Mg, Fe, S;
- microelemente (<0,05% din organismele vii): Zn, Mn, Cu, Co, F, I, Mo.

Macro- și oligoelementele au rol structural și funcțional, iar microelementele au rol catalitic.

Carbonul este elementul cel mai caracteristic pentru materia vie. Rolul biologic al carbonului este determinat de structura electronică și proprietățile chimice particulare: element tetravalent, are posibilitatea de a forma legături chimice simple, duble și triple, concretizate în organism în structuri catenare lineare/ ramificate, lungi/ scurte, închise/ deschise, aromatice, extrem de diverse, cu aspect tridimensional complex. Carbonul se combină în legături covalente și cu N, O, H, P, S.

În organismele vii hidrogenul și oxigenul se găsesc predominant asociați sub formă de apă (H_2O), care este mediu biogen prin excelență.

Azotul în formă liberă nu întreține viața, în combinații însă este indispensabil sistemelor vii: proteinele și acizii nucleici sunt principalii purtători ai informației biologice, astfel încât, prin intermediul lor, azotul reprezintă de fapt suportul material al vieții.

1.2 Constituenții fundamentali

Prin asocierea bioelementelor în organism apar combinații chimice minerale și organice. Combinațiile minerale cele mai importante sunt apa și electroliții (sărurile minerale).

Apa, cel mai abundent constituent al majorității organismelor vii (40-95%), poate fi considerat mediu de dispersie pentru elementele componente ale organismului (organismul este „un sistem dispers").

Apa influențează profund interacțiunea moleculară în sistemele biologice prin cele două proprietăți de bază:

1. **Polaritatea** - molecula de apă este un dipol electric (deși nu are sarcină electrică netă).

2. **Coeziunea internă** - moleculele de apă aflate în vecinătate, exercită o forță de atracție mare una asupra celeilalte, de aceea punctul de topire, de fierbere, căldura de evaporare, de fuziune și tensiunea superficială sunt mai mari decât ale altor hidruri (H_2S, NH_3) sau ale altor lichide comparabile. Aceste proprietăți se datorează distribuției specifice a electronilor în molecula de apă: perechile de electroni puse în comun de atomul de oxigen și cei doi atomi de hidrogen nu aparțin în egală măsură partenerilor; nucleul oxigenului are o forță de atracție mai mare decât al hidrogenului, astfel atomul de oxigen are o încărcătură locală

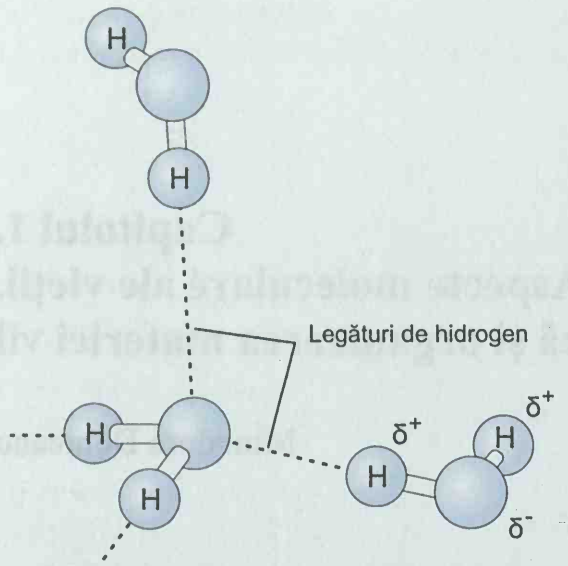


Figura 1.1. Molecula de apă și legătura de hidrogen

parțial negativă δ^-, iar atomii de hidrogen au o încărcătură locală parțial pozitivă δ^+, având drept consecință forma triunghiulară a moleculei și apariția dipolului electric. Analize spectroscopice și de raze X au demonstrat că unghiul legăturilor covalente H-O-H este de 104.5°, amănunt care alături de aranjamentul electronilor în moleculă îi conferă acesteia asimetria electrică.

Atracția electrostatică dintre două molecule de apă are ca rezultat redistribuirea încărcăturii electronice a ambelor molecule, ducând la o asociere electrostatică complexă (*Figura 1.1*) numită "legătura de hidrogen"; datorită distribuției tetraedrice a electronilor în jurul atomului de oxigen, fiecare moleculă de apă este potențial capabilă să formeze legături de hidrogen cu 4 molecule de apă învecinate. Acest lucru are loc în gheața cristalină la 0°C, în care legăturile de hidrogen au maxim de stabilitate, fiind coliniare cu legătura covalentă O-H a moleculei de apă învecinate; în apa lichidă fiecare moleculă formează legături de hidrogen cu alte 3,6 molecule învecinate; pe măsură ce temperatura crește, scade numărul legăturilor de hidrogen intermoleculare. Legătura de hidrogen nu este specifică doar apei (apare și în interiorul proteinelor, acizilor nucleici etc).

$$F = \frac{e_1 \cdot e_2}{D \cdot r^2},$$

F = forța de atracție a doi ioni cu încărcătură electrică opusă;

e_1, e_2 = sarcinile ionilor;

r = raza dintre ioni;

D = constanta dielectrică a solventului (80 D, pentru apă).

Caracteristicile structurale enunțate determină proprietățile apei: este solvent pentru săruri cristaline, pentru compuși polari neionici (glucide, alcooli, aldehide etc.), interacționează cu molecule amfipatice (acizi grași liberi, fosfolipide).

Substanțele dizolvate exercită la rândul lor un efect asupra moleculelor de apă: scad punctul de înghețare, cresc punctul de fierbere, scad presiunea de vapori și conferă soluției proprietatea de a avea presiune osmotică.

Sărurile minerale au roluri variate: rol structural (Ca, P în oase), rol catalitic (Fe, Mg, Zn), importanță fizico-chimică (echilibrul osmotic, acido-bazic, electric în țesuturi) prin prezența Na^+, K^+, Cl^-, $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$, HCO_3^-.

După rolul lor, combinațiile organice (biomoleculele) se împart în: constituenți organici fundamentali ai materiei vii (glucide, lipide, proteine, acizi nucleici) și efectori biochimici (enzime, hormoni, vitamine etc).

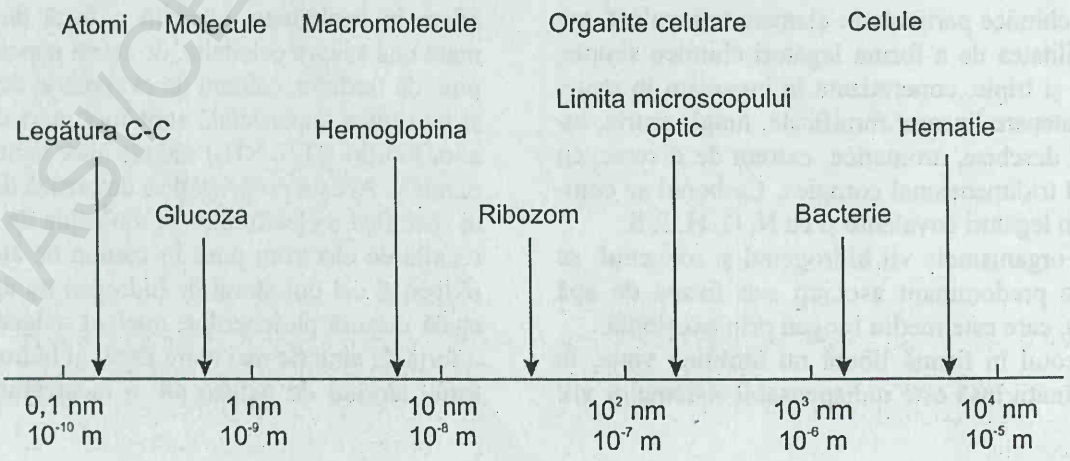


Figura 1.2. Scara dimensiunilor unor biostructuri

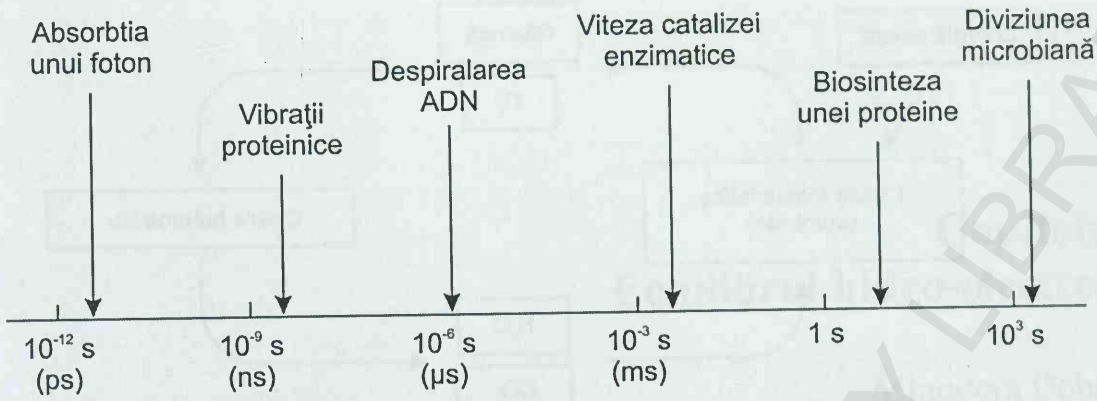


Figura 1.3. Scara desfășurării în timp a unor reacții biologice

1.3 Organismul viu ca sistem organizat

Sistemul organizat este un complex de elemente aflate în interacțiune: substanțele organice și anorganice constituie structuri spațiale tridimensionale între care au loc reacții într-o succesiune și interdependență riguros determinate.

Organismele vii sunt sisteme biologice organizate cu o capacitate funcțională substanțial mai mare decât suma algebrică a funcțiilor structurilor constitutive și cu proprietatea de autoreglare.

Sistemele biologice se diferențiază prin nivele de organizare ierarhizată: organism → organe → țesuturi → celule → agregate moleculare → molecule → atomi.

Pentru menținerea, funcționarea și regenerarea continuă a sistemelor vii, acestea realizează schimburi continue de energie, substanță și informație cu mediul înconjurător. Totalitatea transformărilor de substanță, energie, informație dintr-un organism viu poartă numele de metabolism. Metabolismul are două componente: catabolismul (faza degradativă), prin care din molecule mai mari rezultă molecule mai mici și se produce energie și anabolismul (faza constructivă), prin care din molecule mici, cu consum de energie, se formează produși complecși. Metabolismul asigură homeostazia organismului respectiv (starea staționară structurală și funcțională) prin echilibrul între intrări și ieșiri.

Obiectul biochimiei clinice este studierea proceselor metabolice care au loc în condiții blânde de temperatură, pH și presiune din organismele vii, în contextul homeostaziei sau tulburării acesteia.

1.4 Aspecte moleculare ale vieții: spațiu, timp, energie

Spațiul biologic este volumul ocupat de micro- și macrostructuri. Acesta variază de la nivelul legăturilor chimice la limitele de vizibilitate ale microscopului optic (10^{-7}-10^{-5} m = 0,1-10 μm) și până la de 10^5 ori mai mult (*Figura 1.2*):

- legături chimice: covalentă ~ 1 Å; electrostatică ~ 2-3 Å; de hidrogen ~ 2,5-3 Å; van der Waals < 3-4 Å;
- molecule: glucoza < 1 nm (~ 2,5 Å); hemoglobină - diametru 6,5 nm;
- organite: ribozomi: 0,05 μm (~ 50 nm); virusuri: 10-100 nm;
- elemente celulare: bacterii: 1-2 μm; leucocite ~ 10 μm.

Timpul biologic este durata în care au loc anumite transformări și interacțiuni limitate în spațiu (*Figura 1.3*). De exemplu, recepționarea energiei transportate de un foton în celulele cu conuri din retină (10^{-12} s = 1 ps); mișcarea monomerilor proteici în cadrul structurii cuaternare (10^{-9} s = 1 ns); despiralizarea ADN dublu catenar α-helix corespunzătoare unei gene (10^{-6} s = 1 μs); reacții catalizate de enzime (10^{-3} s = 1 ms); sinteza proteică (60 - 120 s = 1 - 2 minute); multiplicarea bacteriilor (3600 - 7200 s = 1 - 2 ore).

Menținerea homeostaziei sistemelor vii se realizează printr-un aport continuu de energie. Sursa energetică pentru organismele vii este radiația solară; aceasta este folosită în mod direct de organismele autotrofe: plantele verzi fotosintetizează substanțe organice, înmagazinează energia solară în legături chimice ale substanțelor sintetizate. Din CO_2, H_2O și cu aportul luminii solare, se formează substanțe organice (carbohidrați,

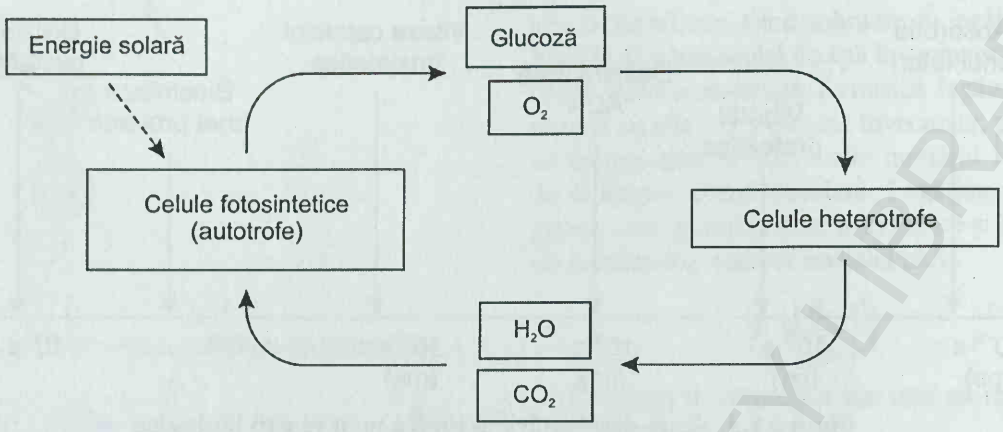


Figura 1.4. Ciclurile carbonului și oxigenului în biosferă

proteine, lipide) și oxigen (*Figura 1.4*). Organismele superioare sunt în general heterotrofe: utilizează energia înmagazinată în legăturile chimice ale substanțelor (glucide, proteine, lipide) sintetizate de autotrofe prin fotosinteză.

Substanțele nutritive obișnuite sunt clasificate în trei categorii: glucidele polizaharidice care se transformă în monozaharide (hexoze, pentoze), proteinele sunt degradate în aminoacizi, iar lipidele - în acizi grași. Prin descompunerea enzimatică a acestora în 3 etape catabolice (*Figura 1.5*), se eliberează inițial unitățile constituente (etapa I), ulterior energia înmagazinată în legăturile chimice fiind transferată prin intermediul legăturilor fosfat macroergice (ATP) consumatorilor (se regăsește sub forma contracției musculare, transportului membranar, biosintezei diverșilor compuși etc). Etapa a II-a constă în transformarea unităților constituente în intermediari mai simpli (piruvat, acetil-coenzimă A), care sunt utilizați în etapa a III-a, în căile catabolice comune (ciclul Krebs și lanțul de oxidare biologică) în scopul eliberării energiei. Căile catabolice sunt convergente: pleacă de la produși variați spre o cale comună simplă (reacții exergonice). Anabolismul (biosinteza) are dimpotrivă, un aspect divergent: pornește de la un număr restrâns de precursori din care rezultă un număr foarte mare de produși finali, cu prețul unui însemnat aport energetic (reacții endergonice).

Eliberarea energiei în organism are loc cu randament diferit, în funcție de tipul anaerob ($\eta = 4$ %) sau aerob ($\eta = 40\%$) al reacțiilor catabolice.

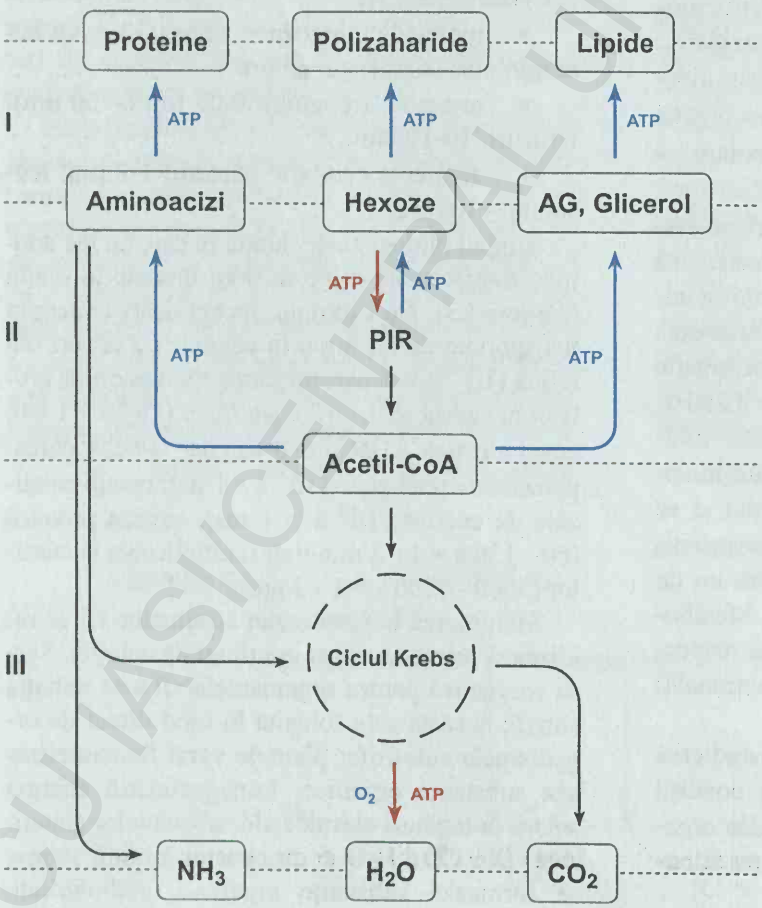


Figura 1.5. Schema generală a metabolismului

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 2.
Echilibrul hidro-electrolitic

Minodora Dobreanu

2.1 Apa şi viaţa

Apa este un component esenţial al tuturor vieţuitoarelor, de la procariotele simple până la organismele superioare. În contrast cu vieţuitoarele unicelulare care trăiesc într-un mediu apos şi sunt nevoite să se adapteze în continuu la modificările fizice şi chimice ale acestuia, organismele multicelulare superioare îşi asigură condiţiile optime pentru existenţă, prin crearea unui mediu intern lichid, a cărui compoziţie şi volum se menţin între limite foarte stricte. Conţinutul în apă al embrionului uman scade treptat de la 95% la 85%, în cursul vieţii intrauterine. Nou-născutul are un conţinut în apă de 82-72%, acesta scăzând la adult paralel cu înaintarea în vârstă, până la 55-50%. La femei, proporţia apei în organism este de obicei mai mică, datorită conţinutului mai mare în grăsimi. Metabolismul apei şi sodiului sunt legate clinic şi fiziologic, de aceea se impune studierea lor concomitentă.

2.2 Distribuţia apei şi electroliţilor în organism

2.2.1. Distribuţia apei

În organismul viu apa este repartizată în diferite compartimente, delimitate prin membrane biologice lipidice. 40% din greutatea corpului (350-450 mL/kg) se află în celule, formând compartimentul intracelular; în acest compartiment se delimitează şi spaţiile de apă din interiorul microorganitelor celulare (mitocondriile, aparatul Golgi, lizozomii, nucleul). Partea rămasă, reprezentând 20% din greutatea corpului (150-250 mL/kg) formează compartimentul hidric extracelular (Fluide Extracelulare = FEC), împărţit în trei fracţiuni: compartimentul interstiţial sau intercelular (14%), compartimentul intravascular - volumul sanguin fluid şi volumul limfatic (4%), respectiv apa paracelulară (transcelulară 2%) - lichidul cefalorahidian, conţinutul tractului

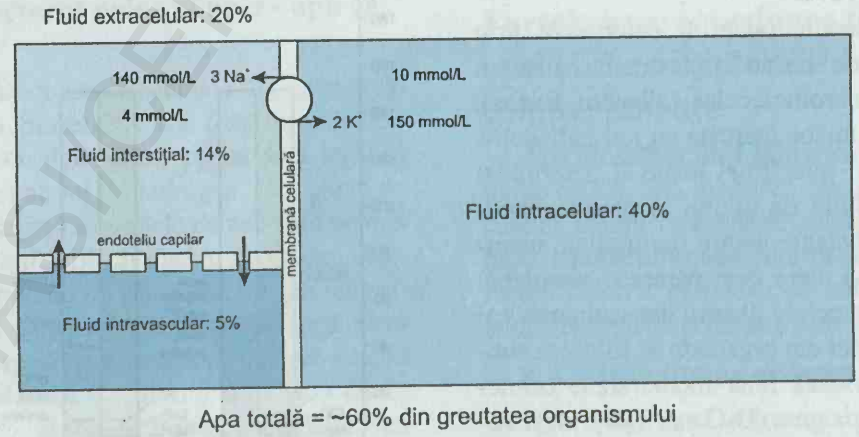


Figura 2.1. Repartizarea compartimentelor hidrice şi a principalilor electroliţi în organism

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 2.I. Concentrația medie a electroliților (mmol/L) și a proteinelor în plasmă, lichid tisular și în interiorul celulelor

Componenți	Plasmă sanguină	Lichid interstițial	Celule
Cationi:			
Na^+	140	140	10
K^+	4	4	150
Ca^{2+}	2,5	2	1
Mg^{2+}	1	1	20
Total:	147,5	143	181
Anioni:			
Cl^-	100	100	10
HCO_3^-	25	25	16
$H_2PO_4^-$	2	2	100
HSO_4^-	1	1	20
Anioni organici	18,7	14,9	20
Proteine	0,8	0,1	15
Total:	147,5	143	181

digestiv și genito-urinar. Apa prezentă în circulație influențează în mod substanțial și volemia, adică dimensiunea volumului plasmatic. Repartiția apei și a principalilor cationi în compartimentele hidrice din organism, precum și raporturile procentuale ale acestora, sunt prezentate în *Figura 2.1.*

Conținutul în apă al diferitelor țesuturi și organe diferă semnificativ: țesutul nervos conține aproximativ 90% apă, în timp ce țesutul adipos are mai puțin de 10%.

Volumul plasmatic poate fi determinat prin analiza gradului de diluție în plasma circulantă a unui colorant macromolecular (albastru Evans), sau a albuminei umane marcate cu iod radioactiv. Volumul spațiului interstițial poate fi determinat prin analiza gradului de diluție în plasma circulantă ale unor substanțe neutre (ca inulina, manitolul și tiosulfații), care deși părăsesc circulația, nu pot pătrunde în celule. Pentru determinarea volumului total al apei din organism se folosesc substanțe care traversează liber membranele celulelor, de exemplu apa grea (D_2O sau T_2O). Deși volumul intracelular nu poate fi determinat în mod direct, poate fi calculat prin scăderea volumului extracelular din valoarea volumului hidric total.

2.2.2. Distribuția electroliților

Cantitatea sodiului din organism este de aproximativ 3700 mmol, din care 25% se află sub formă complexată în oase, iar 75% este supus schimburilor libere între lichidul intracelular (10 mmol/L) și extracelular (140 mmol/L).

Potasiul este distribuit predominant intracelular (150 mmol/L) și mai puțin extracelular (4 mmol/L).

În orice compartiment hidric din organism este valabilă legea electroneutralității: diferențele care apar în *Tabelul 2.I* între sumele concentrațiilor cationilor și anionilor, se datorează acizilor organici care formează lacuna anionică.

Mișcarea spontană a acestor cationi are loc în sensul gradientului de concentrație, astfel sodiul are tendința de a pătrunde în compartimentul intracelular, iar potasiul iese pasiv în spațiul extracelular. Menținerea gradientului de concentrație între cele două compartimente se realizează prin mecanism activ, cu ajutorul unei pompe ionice, Na^+ - K^+ ATP-aza.

Concentrațiile exprimate în mmol/L ale electroliților și proteinelor din plasmă, lichidul interstițial și celule, sunt reprezentate grafic în *Figura 2.2* (Diagrama Gamble) și cifric în *Tabelul 2.I.*

Compoziția diverselor lichide biologice în principalii electroliți este redată în *Tabelul 2.II.* Este posibil să se anticipeze tipul dezechilibrului hidro-electrolitic, după tipul de lichid biologic pierdut excesiv: pierderea de fluide cu compoziție în electroliți similară cu cea a plasmei, reprezintă deshidratări cu valori normale de concentrație ale electroliților în plasmă; dacă conținutul în sodiu al fluidului pierdut este

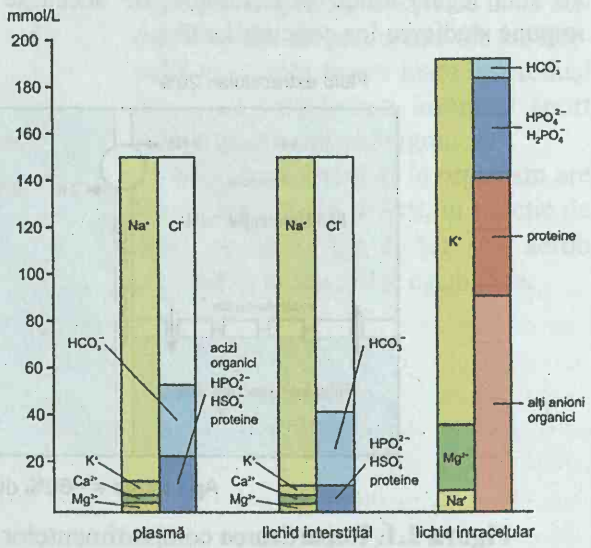


Figura 2.2. Diagrama lui Gamble pentru spațiile celular, interstițial și plasmatic

Tabelul 2.II. Concentrația medie a principalilor electroliți în diverse lichide biologice (mmol/L)

Lichid/Ioni	Na^+	K^+	HCO_3^-	Cl^-
Plasma	140	4	25	100
Suc gastric	50	15	0-15	140
Suc intestinal	140	10	variabil	70
Scaun diareic	50-140	30-70	20-80	variabil
Bila, lichid peritoneal	140	5	40	100
Transpirație	12	10	-	12

mai mic decât al plasmei (de exemplu în transpirație excesivă), deshidratarea se asociază cu hipernatremie; pierderea de fluide intestinale, bogate în potasiu, conduce la deshidratare cu hipokaliemie, fără să afecteze semnificativ natremia.

2.3 Proprietățile apei

Prezența ubicuitară a apei în organismele vii, precum și participarea sa la toate fenomenele vieții, poate fi explicată prin următoarele proprietăți:

- Prin caracterul său polar/dipolic, apa reprezintă un mediu ideal, atât pentru dizolvarea substanțelor polare neelectrolitice și electrolitice, cât și pentru disocierea electrolitică a celor din urmă. Apa se mișcă liber prin porii membranelor biologice semipermeabile, contribuind la instalarea osmozei și a presiunii osmotice.
- Datorită căldurii specifice mari, la încălzire apa absoarbe lent cantități mari de căldură și le eliberează la fel de lent în cursul răcirii - aspect important în menținerea homeotermiei organismelor superioare.

2.3.1 Caracterul polar al apei - apa ca solvent

Apa este una dintre substanțele anorganice cu structură simplă, moleculele sale fiind formate dintr-un singur atom de oxigen, cuplat prin legături covalente cu doi atomi de hidrogen. Din punct de vedere electrostatic, moleculele de apă sunt neutre. Deși moleculele de apă nu dispun de sarcini electrice libere, dispun de un câmp electric, cu intensitatea de 10-18 Coulomb/cm. Această forță electrostatică este creată de așezarea asimetrică a celor 3 atomi în moleculă. Legăturile covalente dintre oxigen și cei doi atomi de hidrogen formează un unghi de 104.5°. Ca urmare, repartiția electronilor în molecule devine inegală: densitatea electronilor va fi mai mare la polul oxigenului și mult mai mică la polul celor doi atomi de hidrogen, moleculele astfel polarizate numindu-se dipoli. Datorită caracterului său dipolic, apa este un solvent ideal pentru substanțele polare, electrolitice și neelectrolitice. Moleculele de apă se orientează cu polul lor negativ spre polul pozitiv al moleculei/ ionului învecinat și invers. Substanțele apolare (grăsimile, lipidele) sunt insolubile în apă și formează emulsii apoase numai în prezența unor detergenți amfipatici.

2.3.2 Căldura specifică a apei

În cazul în care moleculele de apă învecinate se găsesc suficient de aproape (la o distanță maximă de 0,28 nm = 2,8 Å), între ele se pot forma punți de hidrogen. Această orientare ordonată a ansamblului moleculelor de apă este cu atât mai constantă, cu cât temperatura mediului este mai mică. La o temperatură sub 0°C, toți atomii de hidrogen sunt legați prin punți de hidrogen. Din această cauză fiecare atom de oxigen, fixează prin legături de hidrogen încă 4 molecule de apă, cu apariția unei structuri hexagonale caracteristice. Din cauza spațiului închis în mijlocul structurii, volumul gheții este cu 11% mai mare decât volumul apei lichide. Este cunoscut faptul că densitatea apei este maximă la temperatura de +4°C și că aceasta are o importanță fundamentală pentru animalele acvatice. La temperatura de 40°C aproximativ 50% din legăturile de hidrogen intermoleculare se descompun și apa va fi "mai fluidă". Această temperatură reprezintă "cel de-al doilea punct de topire al apei", care este (poate nu întâmplător) foarte aproape de temperatura optimă la care se desfășoară fenomenele vitale în organismele superioare.

2.4 Schimburile hidrodinamice. Forțele care coordonează mișcarea apei și electroliților între compartimente

Apa difuzează liber prin membranele celor mai multe celule, însă mișcarea electroliților și a moleculelor neutre este restricționată. Distribuția apei între compartimentele hidrice este controlată de factori fizici, în particular de conținutul în substanțe dizolvate și de presiunea hidrostatică din vase.

2.4.1 Difuziunea și osmoza

Distribuția apei între mediul intracelular și extracelular este determinată de forțele osmotice. Osmolaritatea este expresia conținutului de substanțe dizolvate într-un volum de solvent dat.

Dacă două soluții cu concentrații diferite sunt separate între ele printr-o membrană semipermeabilă (permeabilă doar pentru moleculele solventului), moleculele solventului vor trece dinspre compartimentul mai diluat spre acela mai concentrat până când presiunea osmotică, respectiv concentrația celor două compatimente se egalizează. Presiunea osmotică este presiunea care trebuie aplicată unei soluții separate de solventul său printr-o membrană semipermeabilă pentru ca solventul să fie împiedicat să treacă în soluție. La temperatura constantă de 0°C (273 Kelvin) și la presiunea exterioară de 1 bar, valoarea presiunii osmotice a unei soluții cu concentrația de 1 mol/L este de 22,41 bar (1 osmol/kg). Efectul osmotic al unei substanțe dizolvate este determinat de numărul de particule din soluție (mol/L) și nu de concentrația procentuală de masă sau de volum: un litru de soluție cu activitatea osmolară de un osmol, conține un număr de $6,023x10^{23}$ particule dizolvate (numărul lui Avogadro). În cursul dizolvării, moleculele de apă și particulele substanțelor dizolvate intră în interacțiuni multiple, din care cauză proprietățile soluțiilor se deosebesc de cele ale solventului pur. Presiunea vaporilor soluțiilor este întotdeauna mai mică decât cea a solventului pur. Această scădere este direct proporțională cu concentrația molară a substanțelor dizolvate, din care cauză temperatura de fierbere va fi mai mare și cea de congelare va fi mai mică, decât cele ale solventului pur: o soluție apoasă cu concentrația de 1 mol/L are punctul ebulioscopic la +100,52°C și punctul crioscopic la -1,85°C. În contrast cu soluțiile neelectroliților (glucoză, ureea), soluțiile apoase ale electroliților vor prezenta valori crioscopice sau ebulioscopice de mai multe ori mai mari, decât cele calculate. De exemplu, punctul crioscopic al unei soluții de NaCl 1 mol/L este de -3,7°C în loc de -1,85°C, datorită numărului dublu de particule prezente în soluție: în cursul dizolvării NaCl disociază electrolitic, ionii componenți izolându-se prin învelișul hidratant, format în jurul lor de stratul dipolilor de apă.

Substanțele cu masă atomică / moleculară mică (Na^+, K^+, glucoza, ureea) au un aport substanțial (90%) în determinarea presiunii osmotice plasmatice, comparativ cu substanțele cu masă moleculară mare (cum ar fi de exemplu proteinele). Substanțele care disociază electrolitic la pH fiziologic vor forma o cantitate de particule corespunzătoare numărului de ioni din care este alcătuită substanța respectivă.

Laboratorul clinic utilizează osmolalitatea în aprecierea conținutului în substanțe dizolvate (exprimată în mmol/kg soluție). Osmolalitatea plasmei este de aproximativ 285-310 mmol/kg, realizând o presiune osmotică de 285-310 mOsm/kg. Osmolalitatea plasmei este dată practic de ioni și moleculele mici, astfel încât în lipsa ebulioscopului sau crioscopului, din concentrația plasmatică – exprimată în mmol/L - a unor compuși osmotic activi (glucoza, Na^+ și K^+), poate fi calculată o valoare a osmolalității destul de apropiată de cea reală, cu ajutorul formulei:

$2([Na^+] + [K^+]) + [Glucoză]/18 + [Uree]/6.$

Înmulțirea cu 2 se face pentru a lua în considerare ionii Cl^-, HCO_3^- și ceilalți anioni asociați. Deși ureea (prin concentrația molară asemănătoare cu a glucozei) are un aport semnificativ la osmolalitatea mediului extracelular, tonicitatea (osmolalitatea efectivă, care influențează schimburile hidrice între compartimente) nu este afectată de concentrația acesteia, deoarece ureea difuzează în egală măsură intra- și extracelular (concentrația fiind egală în cele două spații).

Tonicitatea = Osmolalitate - [Uree]/6

Dacă osmolalitatea urinei primare este identică cu cea a plasmei, osmolalitatea urinei definitive variază de la 80-1200 mmol/L, funcțiile de absorbție și secreție tubulare, fiind esențiale pentru compoziția finală a urinei.

2.4.2 Presiunea coloid-osmotică (oncotică)

Presiunea oncotică se datorează prezenței într-un compartiment lichidian a substanțelor macromoleculare (proteice), care spre deosebire de ioni și molecule de apă, nu traversează membranele celulare și capilarele sanguine (decât într-o măsură foarte mică și în condiții particulare). Având masa moleculară mare, ele nu contribuie la osmolalitate decât într-o măsură nesemnificativă, dar prin faptul că rămân în vasele de sânge, dețin un rol important în distribuția fluidelor între spațiul intravascular și cel interstițial. Presiunea oncotică plasmatică este de 22-27 mmHg.

2.4.3 Presiunea hidrostatică

Presiunea hidrostatică este presiunea din vasele sanguine, rezultat al presiunii mecanice generate de cord. În arterele mari această presiune este aproximativ 100 mmHg, scăzând până la capătul arteriolar al capilarelor la 35 mmHg, iar la nivelul capătului venos al capilarelor este de 15 mmHg.

Endoteliul capilarelor se prezintă ca un tub continuu, cu numeroase canale intercelulare, permeabile pentru apă şi electroliţi. Presiunea efectivă de filtrare în vase este egală cu diferenţa între presiunea hidrostatică şi presiunea osmotică, aceasta fiind contrabalansată de suma presiunii hidrostatice şi osmotice interstiţiale. Având în vedere valoarea presiunii efective de filtrare în cele două compartimente, la capătul arterial al capilarelor, apa şi electroliţii părăsesc vasul spre interstiţiu, iar la capătul venos al capilarelor apa şi electroliţii se întorc în vas. O parte din lichidul interstiţial se întoarce pe cale limfatică.

Lichidul tisular sau interstiţial formează acea parte a compartimentelor de apă care se situează în afara celulelor, dar şi a circulaţiei sanguine. Deşi circulă în sisteme proprii, limfa este încadrată la acest compartiment. Lichidul interstiţial este despărţit de plasma sanguină prin peretele endotelial al capilarelor. Celulele endoteliale sunt fixate între ele printr-o reţea glicoproteică formată de adezine. Cuplarea celulelor endoteliale este însă discontinuă, deoarece între ele apar nişte orificii cu diametrul între 3,0 – 4,5 nm (30 - 45 Å). Din această cauză peretele capilar se comportă ca o membrană poroasă. În mediu apos, schimburile de substanţe prin porii unor asemenea membrane se pot manifesta atât printr-un schimb hidrodinamic al lichidelor din compartimente, cât şi printr-o difuziune simplă, fără modificarea volemiei. Ambele forme au la bază două mecanisme deosebite:

a) Moleculele substanţelor liposolubile şi ale gazelor moleculare (oxigenul, bioxidul de carbon) traversează în mod direct / liber membrana;

b) Moleculele de apă, electroliţii şi neelectroliţii polari ajung în lichidul interstiţial, respectiv înapoi în plasmă, prin traversarea porilor interendoteliali.

Membranele lipidice dispun de numeroşi pori permeabili pentru apă (cu dimensiunea de 0,7 nm), astfel modificările osmolarităţii mediului intra- sau extracelular se repercutează asupra conţinutului în apă şi al volumului celular.

În cazul unui schimb hidrodinamic, cele două compartimente hidrice sunt despărţite de o membrană poroasă, permeabilă atât pentru apă, cât şi pentru substanţele micromoleculare dizolvate. În cazul în care diametrul porilor este suficient de mare (peste 3 nm), deplasarea apei şi a substanţelor dizolvate are loc pe baza gradientelor de concentraţie, iar dacă într-unul din cele două compartimente se manifestă o presiune hidrostatică, aceasta forţează deplasarea soluţiei cu toţi componenţii săi. Dacă microporii au diametrul mai mic de 3 nm, traversarea acestora de către proteinele din soluţie va fi împiedicată de măsura dimensiunilor lor moleculare. Între cele două compartimente se va stabili astfel un gradient proteinic şi concomitent unul coloid-osmotic. Tot din cauza acestei difuziuni împiedicate, similară filtrării, concentraţia proteinelor din lichidele tisulare este substanţial mai mică (10-15 g/L), decât în plasmă (60-80 g/L).

Presiunea coloid-osmotică este relativ constantă în toată plasma circulantă, având valoarea normală de aproximativ 25 mmHg. În partea arterială a capilarelor, presiunea sistemică determină filtrarea din plasmă în ţesuturi a unei cantităţi definite de lichid şi substanţe dizolvate. Spre porţiunea venoasă însă, presiunea sistemică scade sub valoarea presiunii coloid-osmotice. Ieşind de sub suprimare, aceasta din urmă va realiza redifuziunea în plasmă a apei şi a substanţelor dizolvate. În urma creşterii presiunii sistemice filtrante (stază) sau a scăderii presiunii coloid-osmotice (hipoproteinemie) se produc edemele. Desfăşurarea schimburilor hidrodinamice între plasma sanguină şi lichidul tisular, în funcţie de raportul dintre presiunea sistemică şi cea coloid-osmotică, este prezentată în *Figura 2.3.*

Difuziunea moleculelor de apă şi de substanţe dizolvate are la bază mişcarea termică a acestora, ele tindzând să umple în întregime spaţiul disponibil. Din această cauză, difuziunea are loc totdeauna în sensul stabilit de gradientul de concentraţie.

Desfăşurarea continuă a schimburilor de apă şi de substanţe micromoleculare între două com-

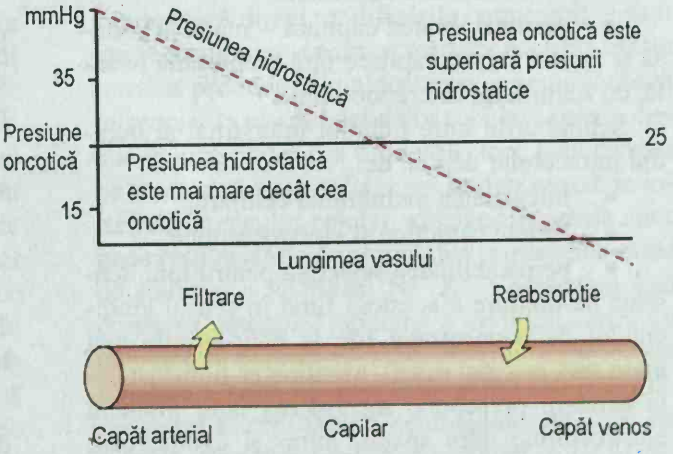


Figura 2.3. Schimburile hidrodinamice între plasmă şi lichidul interstiţial (Starling)

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

partimente nu se opreşte în urma stabilirii stării de echilibru. Din momentul echilibrării reciproce a gradientelor de concentraţie, se stabileşte o stare staţionară aparentă, dar pe baza unui echilibru dinamic, caracterizat prin realizarea în ambele sensuri şi în egală măsura a schimburilor.

Ţinând cont de volumul plasmatic relativ redus (1650 mL), în acest compartiment creşterea volumului şi scăderea osmolarităţii (hipervolemie hipoosmotică) ar fi posibile chiar şi în urma unui consum moderat de lichide. Compartimentele hidrice sunt însă delimitate între ele prin membrane poroase, ceea ce face ca echilibrarea prin difuziune a volumelor de apă şi a concentraţiilor de substanţe să aibă loc continuu între ele. Astfel, cantităţile de apă, de electroliţi şi neelectroliţi de dimensiune mică, nu se distribuie numai în volumul plasmatic, ci şi în spaţiul interstiţial (acesta din urmă, având volumul total de 8-10 ori mai mare decât al plasmei). Acest volum este numit şi "volumul prerenal", deoarece depozitează temporar (dar imediat) cantităţi considerabile de apă şi substanţe dizolvate, până la excreţia definitivă renală a acestora.

În concluzie, schimburile care au loc la nivelul capilarelor, între plasmă şi interstiţiu, sunt influenţate de:

- diferenţele de presiune osmotică şi coloid-osmotică între plasmă şi lichidul interstiţial;
- presiunea hidrostatică a sângelui capilar;
- drenajul limfatic;
- tensiunea în ţesuturi - aceasta fiind mai mare la nivelul musculaturii şi ţesutului interstiţial palmar, aici nu se formează edeme; în schimb tensiunea fiind scăzută la nivelul gleznelor şi pleoapelor, aceste regiuni sunt locurile predilecte pentru formarea edemelor.
- permeabilitatea capilară – măduva osoasă şi ficatul conţin capilare fără membrană bazală, cu spaţii largi interendoteliale.

Schimburile între lichidul interstiţial şi lichidul intracelular depind de:

- integritatea membranei celulare;
- forţele osmotice şi electrochimice;
- permeabilitatea selectivă pentru ioni, tendinţa de migrare a acestora fiind în sensul gradientului de concentraţie (de la concentraţia mai mare spre cea mai mică). Menţinerea homeostaziei celulare presupune menţinerea unui gradient electrochimic între spaţiul intra- şi extracelular, realizat în special cu ajutorul pompei de Na^+.

2.5 Homeostazia sodiului şi apei

La animalele superioare menţinerea homeostaziei, adică a volumului şi compoziţiei constante a mediului intern, este asigurată prin funcţionarea unor mecanisme de reglare complicate şi organizate pe nivele multiple. Aceste mecanisme menţin:

- izovolemia, adică volumul optim al lichidelor din organism;
- izoosmoza şi izoionia sau cantitatea optimă a neelectroliţilor şi electroliţilor cu molecularitate redusă;
- izohidria, adică reacţia (aciditatea, concentraţia ionilor de H^+) normală a mediului.

Izoosmoza reprezintă una din condiţiile de bază ale păstrării integrităţii biostructurilor. Într-un mediu hiperosmotic, celulele cedează apa spre exterior şi pierd volum. În medii hipoosmotice însă, din cauza pătrunderii excesive a apei în interiorul lor, se balonează, chiar până la citoliză. Soluţia izoosmotică de (NaCl) conţine 9 g sare la un litru, adică câte 154 mmol/L de Na^+ şi tot atât de Cl^-; această soluţie are punctul crioscopic de -0,56°C, osmolaritatea de 302,6 mosm/L.

Stabilitatea mediului intern presupune constanţa activităţii osmotice (osmolarităţii) şi a volumului plasmatic (izovolemia). În cursul schimburilor hidrodinamice patologice, aceşti parametri se pot modifica atât în sensul scăderii, cât şi al creşterii lor, fenomene care afectează profund stabilitatea structurilor celulare şi subcelulare, precum şi activitatea numeroaselor sisteme enzimatice de care depinde metabolismul organismului.

2.5.1 Controlul homeostaziei sodiului - conservarea sărurilor

Aportul alimentar de sodiu este foarte variabil (2-15 g Na^+/zi), reglarea homeostaziei realizându-se la nivelul eliminării acestuia din organism; sodiul se elimină pe următoarele căi:

- 95% - renală, cantitatea eliminată fiind sub controlul aldosteronului,
- 4,5% - prin fecale şi
- 0,5% - prin transpiraţie.

2.5.1.1 Controlul renal al homeostaziei sodiului – sodiul şi volumul lichidului extracelular

Zilnic sunt filtraţi 20000 - 30000 mmol de sodiu, din care doar 100 - 200 mmol ajung în urina finală, adică doar 1% din cantitatea filtrată.

În tubul contort proximal, 70% din Na^+ filtrat se absoarbe activ, prin canale ionice specifice (la schimb cu protoni) şi în cotransport cu glucoza, aminoacizii, unii anioni (fosfaţi, Cl^- şi mai puţin a HCO_3^-) paralel cu absorbţia pasivă a apei. Rata de filtrare glomerulară (care depinde de presiunea hidrostatică şi oncotică) influenţează la acest nivel reabsorbţia de sodiu. Conţinutul în substanţe dizolvate neabsorbite (de exemplu manitolul) sau în exces (glucoză, corpi cetonici) influenţează reabsorbţia de sodiu, reţinând apa în tub. Prin acest mecanism apare poliuria datorită diurezei osmotice în cetoacidoza diabetică.

În ansa ascendentă a tubului Henle, 25% din Na^+ filtrat se absoarbe activ, fără apă; lichidul care părăseşte această zonă este hipoton. Se crează un gradient osmotic în interstiţiul renal, care creşte dinspre corticală spre medulară (la nivelul medularei acesta poate ajunge la 200-1000 mOsm/L) şi asigură absorbţia apei în tubii colectori.

În tubul contort distal, 4 - 4,5% din Na^+ filtrat se reabsoarbe, la schimb cu K^+ şi H^+, acest proces fiind controlat de aldosteron. Acest segment este responsabil de echilibrul final al sodiului în organism şi prin reglarea conţinutului în apă al compartimentului circulant, reglează presiunea sanguină.

2.5.1.2 Sistemul Renină - Angiotensină - Aldosteron

Aldosteronul este un hormon produs în zona glomerulară a corticosuprarenalei, secreţia lui fiind controlată de sistemul renină-angiotensină. Este responsabil de reglarea volumului lichidian al spaţiului extracelular şi controlează homeostazia potasiului.

Rinichii participă la osmoreglare printr-un mecanism propriu. Aparatul juxtaglomerular este situat în apropierea glomerulilor (între arteriolele aferentă, eferentă şi porţiunea iniţială a tubului contort distal), fiind format dintr-un ansamblu de celule musculare netede transformate în peretele vaselor preglomerulare (*celule juxtaglomerulare*) şi celule epiteliale mai dense (*macula densa*) din peretele tubular distal. Aceste celule dispun de receptori sensibili faţă de modificările presiunii sanguine şi osmolarităţii lichidului care trece prin tubul urinifer. Celulele juxtaglomerulare sintetizează şi depozitează în citoplasma lor, sub formă de granule, o enzimă proteolitică numită renină. În cazul scăderii irigaţiei sanguine renale sau a conţinutului în sodiu al tubului contort distal, renina se eliberează prin degranulare. Aceasta protează descompune o α-2-glicoproteină plasmatică (de origine hepatică), numită angiotensinogen (alcătuită din mai mult de 400 Aa, cu greutate moleculară variabilă, însă), cu eliberarea unui decapeptid, numit angiotensină-I. Aceasta este încă inactivă, dar sub acţiunea unei alte peptidaze produse în vasele pulmonare, numită angiotensinază sau convertază (Angiotensin Converting Enzyme, ACE), prin eliberarea proteolitică a doi aminoacizi terminali, se transformă într-un octapeptid, numit angiotensină-II (AT II), care este purtătorul de semnal propriu-zis al sistemului osmoreglator.

Acţiunea vasoconstrictoare a angiotensinei-II se manifestă pe de o parte la nivelul pereţilor arteriolelor precapilare, ducând la creşterea marcată şi generalizată a presiunii arteriale sistemice. Acest lucru se realizează prin intermediul receptorilor membranari AT 1 R, care transmit semnalul prin proteinele G şi fosfolipaza C; DAG şi IP3 eliberate duc la mobilizarea Ca^{2+} din reticulul sarcoplasmic, iniţiind astfel răspunsul contractil al musculaturii netede vasculare (complexul calmodulină – 4 Ca^{2+} activează kinaza lanţurilor de miozină uşoară, care fosforilează lanţurile uşoare de miozină şi creşte tonusul musculaturii netede vasculare). AT II se formează şi la nivel renal (celulele endoteliale glomerulare, dar şi cele tubulare, produc ACE), unde influenţează reabsorbţia tubulară şi tonusul vascular renal printr-o acţiune auto- şi paracrină.

Pe de altă parte, AT II stimulează puternic producţia de aldosteron în celulele zonei glomerulare a corticosuprarenalei. Prin creşterea reabsorbţiei sodiului şi a excreţiei potasiului la nivelul tubilor renali distali şi colectori, acest hormon produce o hipersodemie şi o hipopotasemie marcată. Celulele producătoare de aldosteron, recepţionează direct modificările concentraţiei sanguine a sodiului. În urma scăderii acesteia creşte imediat producţia de aldosteron, care acţionează în special la nivelul celulelor tubulare renale distale şi a celulelor din tubii colectori, prin fixarea pe un receptor citosolic, care se deplasează în interiorul nucleului celular, afectând expresia unor gene responsabile de activitatea proteinelor canal de sodiu şi a ATP-azei Na^+/K^+. Consecinţa este creşterea retenţiei tubulare a sodiului, ceea ce conduce la corectarea hipoosmozei. Reabsorbţia tubulară a sodiului este urmată în mod pasiv de reabsorbţia cantităţilor echivalente de ioni de clorură, care, fiind puternic hidrataţi, aduc în circulaţie cantităţi considerabile de apă, din care

Tabelul 2.III. Bilanțul hidric zilnic

Pierderi prin:		Câștig din:	
Piele	200 mL	Metabolism oxidativ	400 mL
Plămâni	400 mL	Aport minim prin dietă	1100 mL
Digestive	100 mL		
Renale	800 mL		
Total:	*1500 mL*	*Total:*	*1500 mL*

cauză va creşte şi volumul plasmatic. Concentraţia plasmatică bazală a aldosteronului se situează în intervalul 0,05-0,15 μg/L, iar timpul de înjumătăţire plasmatic este de 3-6 ore, inactivarea realizându-se la nivel hepatic. AT II are un timp de înjumătăţire plasmatic foarte scurt (1-2 minute), pe lângă efectul hipertensiv imediat, având şi un efect de stimulare directă a secreţiei de ADH şi aldosteron.

În ciuda efectelor sale vasoconstrictoare puternice, se pare că rolul fiziologic primordial al sistemului renină - angiotensină constă totuşi în reglarea volemiei şi a osmolarităţii plasmatice, prin acţiunile cunoscute ale aldosteronului, manifestate la nivelul tubilor renali distali. Schema funcţionării sistemului renină – angiotensină - aldosteron şi relaţia cu homeostazia apei, sunt prezentate în *Figura 2.4.*

La pacienţii cu insuficienţă cortico-suprarenală la care se administrează terapie de substituţie cu doze fixe de mineralocorticoizi, homeostazia sodiului este păstrată, ceea ce a condus la concluzia că reabsorbţia sodiului este influenţată şi de alţi factori decât aldosteronul, cum ar fi familia peptidelor natriuretice, implicată în reglarea volumului intravascular al fluidelor. Peptidul natriuretic atrial (ANP), oligopeptid produs în pereţii atriilor ca răspuns la distensie (expansiu-

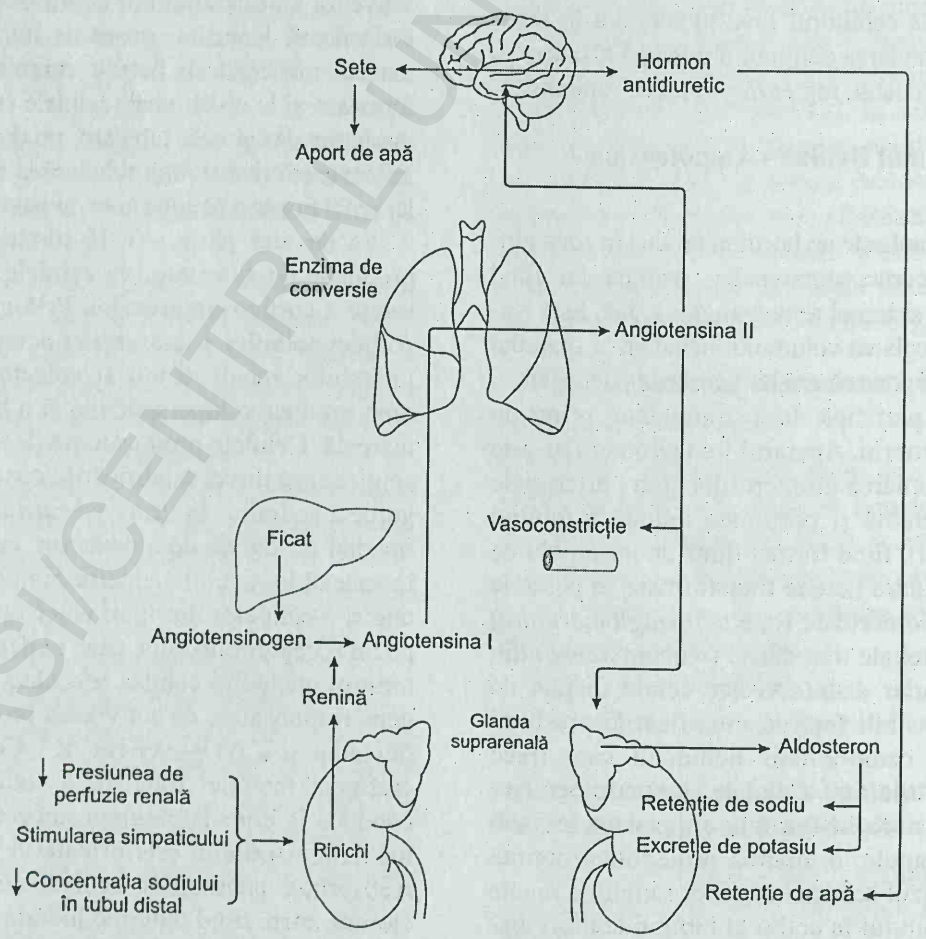


Figura 2.4. Sistemul Renină-Angiotensină-Aldosteron (modificat după Kaplan)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ne a volumului lichidului extracelular) inițial sub formă de pro-ANP (126 aminoacizi), este activat prin două scindări proteolitice la forma activă ANP (28 Aa). Are ca principal efect intensificarea eliminării de sodiu prin scăderea reabsorbției tubulare distale a acestuia, inhibarea secreției de renină și în ultimă instanță de aldosteron; antagonizează de asemenea efectul presor al noradrenalinei și AT II. Peptidul natriuretic cerebral (BNP) este sintetizat în ventriculii cardiaci, ca răspuns la supraîncărcarea de volum. Este produs inițial sub formă inactivă pro-BNP (108 Aa), iar ulterior prin două scindări proteolitice rezultă forma activă a peptidului (32 Aa), a cărui mesaj natriuretic se transmite prin intermediul unor receptori A (în celulele endoteliale) și B (în creier). Concentrația serică a BNP crește în insuficiența cardiacă, fiind un important element de diagnostic diferențial cu dispneea de alte cauze. Peptidul natriuretic de tip C (CNP) este prezent în concentrații mari în endoteliul vascular și este un vasodilatator.

2.5.2 Controlul homeostaziei apei – reglarea osmolarității lichidului extracelular

La persoanele sănătoase de obicei aportul hidric este excedentar necesităților, excesul fiind eliminat pe cale renală. Pierderile prin transpirație, respirație, fecale, sunt considerate minore, totuși trebuie luate în considerație mai ales în anumite circumstanțe (diaree, mediu cald și umed) – *Tabelul 2.III.*

Filtratul glomerular este de 200 l de apă pe zi, din care 80% se reabsoarbe împreună cu Na^+ în tubul contort proximal; restul (19,5%) se absoarbe în tubii colectori sub acțiunea ADH (adiuretina, ADH), iar 1-2 litri se elimină.

Din cauza capacității sale strâns determinate de limitele funcționale renale, mecanismul conservării apei poate asigura echilibrarea devierilor volemiei și osmolarității plasmei numai până la o anumită limită. Pentru funcționarea optimă a mecanismului este necesar un aport zilnic suficient de apă. Cantitatea minimă de lichid eliminată la nivel renal este de 500 mL/zi. Această cantitate este volumul hidric necesar pentru eliminarea renală (la capacitatea maximă de concentrare renală: 1200 mmol/L) a produșilor de metabolism hidrosolubili rezultați zilnic.

Reglarea homeostaziei apei este dublă:

- la nivelul aportului prin mecanismul setei;
- la nivelul eliminării renale prin intermediul receptorilor pentru ADH (hormon antidiuretic - nonapeptid).

Modificarea conținutului în apă al organismului, independent de conținutul în substanțe dizolvate, va duce la modificarea osmolarității. Creșterea osmolarității fluidului extracelular peste 282 mOsm/L produce:

- deplasarea apei din mediul intracelular spre lichidul extracelular,
- stimularea centrului setei în hipotalamus (datorită deshidratării neuronilor hipotalamici) - se manifestă prin necesitatea de a bea,
- stimularea directă a osmoreceptorilor din hipotalamus duce la sinteză și eliberare de ADH.

Figura 2.5 prezintă schematic mecanismul reglării volemiei. Scăderea sub o valoare critică a volemiei sesizată de baroreceptorii aortici, carotidieni și receptorii de distensie din peretele atrial (și transmisă la hipotalamus prin intermediul nervilor IX și X) și/sau creșterea osmolarității plasmei și lichidului interstițial „sesizată" de către osmoreceptorii din neuronii hipotalamici aflați în structura *Organus Vasculosus Lamina Terminalis* – OVLT, sunt factorii declanșatori ai mecanismului de reglare. Impulsurile nervoase care pornesc din OVLT înaintează spre zonele corticale senzitive, unde se manifestă senzorial (apariția senzației de sete). În urma satisfacerii setei (consum de apă sau lichid) crește din nou volumul plasmatic, scade osmolaritatea și temporar se restabilește echilibrul între izovolemie și izoosmoză.

Chiar și o creștere cu 1% a osmolarității (peste 282 mOsm/L) are influență asupra hipotalamusului. Semnalele se transmit în nucleii supraoptic și paraventricular unde se produce ADH (care se depozitează ulterior în hipofiza posterioară), dar și la lobul posterior al hipofizei, unde provoacă eliberarea hormonului antidiuretic, acesta fiind depistat în plasmă. Creșterea cu 1% (~ 3 mOsm/kg) a osmolarității efective conduce la o creștere a ADH plasmatic cu 2pg/mL, ceea ce concentrează urina de trei ori (de la 200 la 600 mOsm/kg).

Dacă creșterea osmolalității plasmatice survine ca urmare a creșterii concentrației unei substanțe ce străbate liber membranele celulare (ex. ureea), osmolalitatea lichidului intracelular va crește și ea, astfel încât osmoreceptorii hipotalamici nu vor mai fi stimulați. Acțiunea ADH (legat de receptorii V2 din celulele tubulare renale) se manifestă prin creșterea permeabilității tubilor colectori (mecanism AMPc

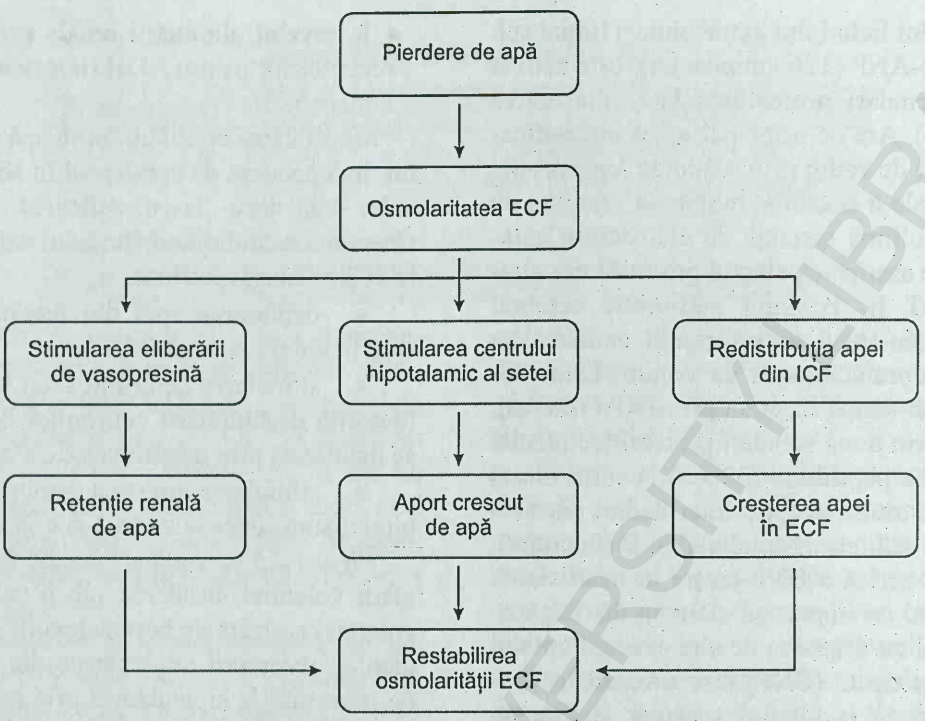


Figura 2.5. Mecanismul reglării volemiei

dependent – AMPc activează o proteinkinază A, care fosforilează AQP_2 – aquaporine citoplasmatice care vor fi translocate membranar, rezultând o creştere a capacităţii de transport a apei transmembranar): apa trece în lichidul interstiţial (osmolaritatea crescută în medulara renală este obţinută prin "mecanismul de multiplicare în contracurent" al absorbţiei sodiului în ansa ascendentă a tubului Henle). Din mediul hipoosmotic intratubular, apa trece spontan (fără nici un consum energetic) în ţesutul hiperosmotic interstiţial, de unde pătrunde din nou în sângele vaselor recta peritubulare. Ca urmare se va elimina un volum mai mic de urină, dar mai concentrată şi va creşte volumul plasmatic, paralel cu scăderea consecutivă a osmolarităţii sale.

La concentraţii mari (farmacologice, non-fiziologice), ADH se leagă şi la receptorii de tip V1 din musculatura netedă vasculară, celule mezangiale şi plachete, care (prin intermediul proteinelor G) activează fosfolipaza C, care eliberează IP3 şi DAG din PIP2. Creşterea calciului citosolar produsă de IP3, activează protein kinaza C, care activează mai departe *myosin light chain kinaza* (MLCK) şi produce contracţia celulei musculare netede.

Este de remarcat că, în mod normal/ fiziologic, mecanismele de reglare sunt mai sensibile faţă de modificările osmolarităţii, hipovolemia devenind un stimul puternic pentru producerea / eliberarea de ADH doar dacă descreşterea volumului plasmatic este mai mare de 10% (*Figura 2.6*).

Dat fiind faptul că, în urma descreşterii volumului plasmatic, descreşte şi presiunea arterială, în reglarea volemiei sunt importante şi semnalele emise de baroreceptorii (receptori sensibili la modificările presiunii sistemice) din pereţii vaselor mari (aorta, carotide) şi ai atriilor şi transmit semnale spre centrii hipotalamici, prin intermediul nervilor IX şi X. Refacerea presiunii arteriale şi a conţinutului în sodiu, duce la reducerea secreţiei ADH: arcul reflex baro-neuro-hormonal se închide cu scăderea permeabili-

Tabelul 2.IV. Controlul secreţiei de vasopresină

Factori stimulatori	Inhibitori
• Creşterea osmolarităţii LEC • Hipovolemie severă (prin AT II şi baroreceptorii vasculari) • Exerciţiul fizic • Stress, durere, fumat • Medicamente: derivaţi de sulfonil uree, carbamazepina, clofibrat, vincristina, analgeticele, narcoticele	• Descreşterea osmolarităţii LEC • Hipervolemia • Consum de alcool, fenitoina

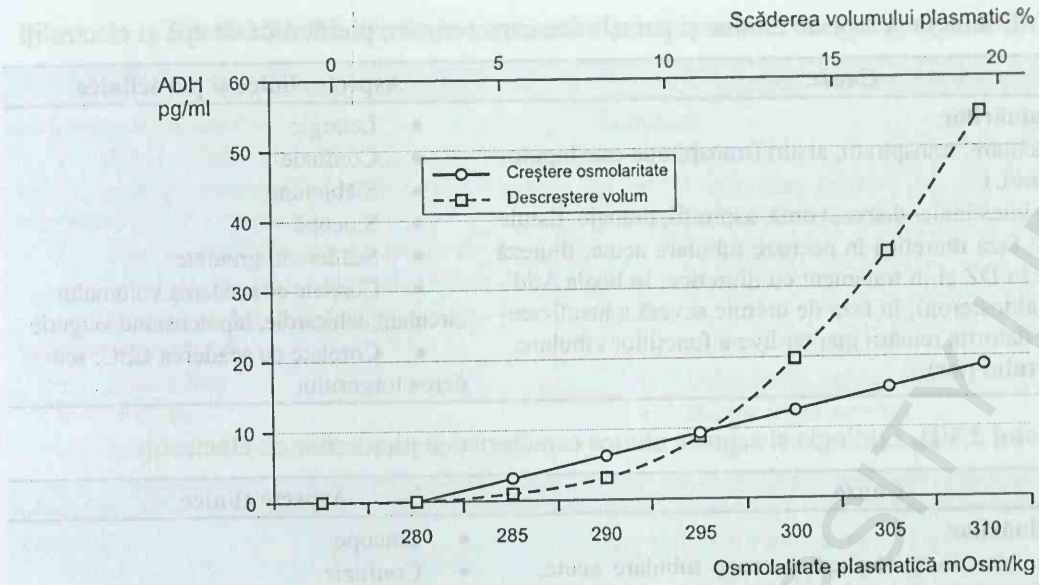


Figura 2.6. Concentraţia plasmatică a ADH în funcţie de volumul şi osmolalitatea plasmatică

tăţii faţă de apă a pereţilor tubilor colectori renali. Ca urmare se va reduce şi reabsorbţia apei în circulaţie, se va elimina o urină voluminoasă şi diluată, respectiv volumul plasmatic se va reduce paralel cu creşterea osmolarităţii. Factorii care influenţează secreţia de ADH sunt redaţi în *Tabelul 2.IV.*

Timpul de înjumătăţire al ADH plasmatic este de 18-20 minute, inactivarea acestuia având loc la nivel hepatic şi renal. Reiese că menţinerea volemiei şi a osmolarităţii optime a organismului se realizează prin funcţionarea şi conlucrarea unor mecanisme umorale şi nervoase. Devierile osmolarităţii sunt compensate prin modificările corespunzătoare ale volemiei şi invers.

Insuficienta secreţie a ADH, mutante ale receptorului ADH sau aquaporinei-2, pot avea ca şi consecinţă apariţia diabetului insipid (caracterizat în principal de eliminarea masivă – 30 l/zi - a unei urini apoase şi sete imperioasă).

Un deficit înnăscut, destul de rar însă, este sindromul Liddle (pseudoaldosteronismul), caracterizat prin reabsorbţie excesivă de sodiu şi hipertensiune arterială severă, datorate unei mutaţii dominante a subunităţii beta (mai rar gama) a canalului de sodiu din tubii colectori, care conduce la reabsorbţie excesivă a sodiului însoţită de alcaloză metabolică hipopotasemică. De remarcat că nivelul seric al reninei şi aldosteronului sunt scăzute.

Tabelul 2.V. Aspecte clinice şi de laborator în pierderea de Na^+ sau apă

Pierdere de:	Na^+	Apă
[Na] plasmatic	N sau ↓	↑
Hematocrit	↑↑↑	N sau uşor ↑
Volum LEC	↓↓↓	N
[Uree] plasmatică	↑	N
Diureza	↓	↓↓↓
Sete	Tardiv	Precoce
Tahicardie/ hipotensiune	Precoce	Tardiv

2.5.3 Determinarea statusului sodiului şi apei

Este esenţială atât evaluarea clinică, cât şi cea de laborator (*Tabelul 2.V*).

Din punct de vedere clinic au semnificaţie senzaţia de sete, starea de hidratare a tegumentelor şi mucoaselor (se examinează limba şi se determină turgorul pielii). Se măsoară presiunea venoasă centrală (PVC) şi, în caz de deshidratare severă, se constată scăderea presiunii arteriale şi puls tahicardic. Se ţine evidenţa modificării masei corporale şi se notează bilanţul hidric (în urma deshidratării, apare oligurie).

Dintre determinările de laborator sunt importante nivelurile plasmatice ale Na^+ şi K^+. Concentraţiile lor se pot determina prin flamfotometrie, folosind ser diluat de 20 de ori (în caz de hipertrigliceridemie se vor obţine valori mai mici pentru sodiu). O altă metodă prin care se poate determina concentraţia cationilor este electrometria; în acest caz se lucrează din plasmă sau ser nediluat (direct), ceea ce evită artefactele rezultate din diluţie. Informaţii importante despre starea pacientului deshidratat ne pot da valorile concentraţiei hemoglobinei/ hematocritului, albuminemia, uremia, glicemia, corpii cetonici, osmolaritatea plasmei, volumul urinar/ diureza.

BCU TIRGU MURES LIBRARY

Tabelul 2.VI. Etiologia şi aspecte clinice şi paraclinice caracteristice pierderilor de apă şi electroliţi

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
Creşterea eliminărilor • Tegumentare: transpiraţii, arsuri (transpiraţia este hipotonă, 20-60 mOsm/L) • Gastro-intestinale: diaree, vomă, aspiraţii, drenaje, fistule • Renale: faza diuretică în necroze tubulare acute; diureză osmotică apare în DZ şi în tratament cu diuretice; în boala Addison (deficit de aldosteron); în faza de uremie severă a insuficienţei renale acute datorită reluării mai tardive a funcţiilor tubulare. **Scăderea aportului** (rar)	• Letargie • Confuzie • Slăbiciune • Sincopă • Scădere în greutate • Corelate cu scăderea volumului circulant: tahicardie, hipotensiune, oligurie • Corelate cu scăderea LEC: scăderea turgorului

Tabelul 2.VII. Etiologia şi aspecte clinice caracteristice pierderilor de electroliţi

Cauze	Aspecte clinice
Creşterea eliminărilor • Renale: faza diuretică după necroze tubulare acute, terapie diuretică, deficienţă de mineralocorticoizi • Tegumentare: transpiraţii excesive, arsuri şi dermatite extinse • Digestive: diaree, vomă, drenaje, fistule, ileus, obstrucţii intestinale **Scăderea aportului** • Apare de cele mai multe ori ca o consecinţă (prin nesuplimentare) a pierderilor excesive	• Sincope • Confuzie • Slăbiciune • Scădere în greutate • Corelate cu scăderea volumului circulant (apar rapid): tahicardie, hipotensiune • Oligurie moderată • Corelate cu scăderea LEC: scăderea turgorului

2.6 Tulburări ale metabolismului apei şi sodiului

Volumul lichidului extracelular este direct dependent de cantitatea (concentraţia) de sodiu în acest spaţiu, aportul/ eliminarea apei fiind în sensul menţinerii constante a concentraţiei sodiului. În general, mecanismul de control al volumului lichidului extracelular răspunde mai puţin prompt şi mai puţin precis decât osmolaritatea (cu excepţia pierderilor severe de lichide). Desfăşurarea normală a proceselor vitale este periclitată în egală măsură, atât din cauza lipsei (hipoosmoză), cât şi a excesului sărurilor (hiperosmoza). Rinichii joacă rolul fundamental în reglarea acestor parametri, sub controlul corticosuprarenalelor. În practica medicală apar cel mai frecvent următoarele combinaţii: a) hipovolemia izoosmotică (hemoragii); b) hipovolemia hiperosmotică (exicoza, pierdere de apă); c) hipovolemie hipoosmotică (carenţa, pierdere de sare) şi d) hipervolemia izoosmotică (hiperfuncţie corticosuprarenală, perfuzii excesive).

2.6.1 Pierderile combinate de apă şi sodiu

Acestea sunt cazurile cele mai frecvente. Termenul de "deshidratare" este impropriu, fiindcă înseamnă doar pierdere de volum. Caracteristicile pierderilor de apă şi electroliţi sunt prezentate în *Tabelul 2.VI.*

2.6.2 Pierderi preferenţiale de apă

Pierderile de apă fără pierdere concomitentă de sodiu sunt mai rare, apar de obicei când se pierd secreţii sărace în electroliţi (transpiraţia). Etiologia şi aspectele clinice ale pierderilor preferenţiale de apă sunt descrise în *Tabelul 2.VII.*

2.6.3 Pierderea preferenţială de sodiu

Pierderile de sodiu sunt însoţite obligatoriu de pierderi de apă, astfel scade lichidul extracelular, uneori chiar şi cel intracelular. *Tabelul 2.VIII* cuprinde principalele aspecte legate de etiologia şi manifestările clinice ale pierderilor de electroliţi.

2.6.4 Excesul de apă

Excesul de apă este cauzat de obicei de o eliminare deficitară şi mai rar, de un aport excedentar (*Tabelul 2.IX*).

2.6.5 Hipernatremia şi excesul de sodiu

Hipernatremia şi excesul de sodiu se datorează de cele mai multe ori pierderilor de apă, dar apare şi din alte cauze (*Tabelul 2.X*).

Edemele apar când cantitatea de lichide ieşite la capătul arterial capilar este mai mare decât cantitatea care intră la capătul venos al capilarului. Cauza poa-

Tabelul 2.VIII. Etiologia şi aspecte clinice caracteristice pierderilor de apă

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
Creşterea eliminărilor • Renale: diabetul insipid, afecţiuni tubulare renale, creşterea osmolarităţii urinare (DZ, diuretice osmotice de ex. manitol) • Tegumentare: transpiraţie excesivă • Prin plămâni: hiperventilaţie (febră) • Digestive: diaree prelungită (la copii) **Scăderea aportului** • Inconştienţi • Disfagie • Restricţionarea aportului (copii, vârstnici) • Dereglarea centrului osmoreglator hipotalamic (accidente vasculare cerebrale, tumori cerebrale)	**Simptome** • Sete • Uscăciunea gurii • Dificultăţi de deglutiţie • Slăbiciune • Confuzie **Semne** • Scădere în greutate • Uscăciunea mucoaselor • Hiposecreţie salivară • Oligurie însemnată (rapid) • Creşte sodiul plasmatic; semnele depleţiei volemice apar tardiv (tahicardia, hipotensiunea, scăderea turgorului) şi sunt mai puţin exprimate • Poate apare disfuncţie cerebrală, comă

Tabelul 2.IX. Etiologia şi aspecte clinice caracteristice excesului de apă

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
Aport excesiv • Polidipsia psihogenă • Eliminare deficitară • Secreţie crescută de ADH (tumori pulmonare cu celule mici, traumatisme, leziuni chirurgicale, infecţii, afecţiuni ale SNC) • Hipocorticism • Hipotiroidism • Medicaţie: tolbutamida, citotoxice şi imunosupresive (ciclofosfamida, vincristina) **Aport crescut şi excreţie scăzută** • Lichide administrate intravenos intra- şi postoperator	• Apare edem cerebral cu migrene, confuzie, convulsii, comă, cutia craniană fiind un spaţiu rigid • Hiponatremia produce scăderea presiunii osmotice extracelulare, astfel apa intră în celule, are loc "balonarea celulară"

te fi creşterea presiunii hidrostatice venoase (în deficitul de pompă al inimii), respectiv scăderea presiunii oncotice (în cazul hipoalbuminemiei).

2.6.6 Hiponatremia

Scăderea concentraţiei sodiului plasmatic nu este echivalentă cu pierderea de sodiu. Hiponatremia poate fi de trei tipuri:

1. Cu osmolalitate crescută (în cazul în care în plasmă există în concentraţie exagerată, alte substanţe osmotic active: glucoză în coma hiperosmolară, manitol etc.);
2. Cu osmolalitate normală (în cazul în care în plasmă există în compensare, alte substanţe osmotic active: în hiperglicemie, hiperlipidemie severă, hiperproteinemie);
3. Cu osmolalitate scăzută şi atunci hiponatremia se interpretează în funcţie de modificările volumului lichidului extracelular:

a. Hiponatremie cu scăderea lichidului extracelular (LEC): în cazul pierderilor renale, gastrointestinale, tegumentare

b. Hiponatremie cu LEC normal:

– dacă recoltarea sângelui s-a făcut pe o canulă pe care s-a injectat anterior o altă soluţie;

– în cazuri de hipertrigliceridemie, hiperproteinemie (paraproteinemie)

– în prezenţa unei soluţii care nu penetrează membrana celulară (ex. manitol), creşte osmolaritatea LEC, apa trece din celulă în spaţiul extracelular, cu scăderea aparentă a concentraţiei de sodiu plasmatic.

– "Sick cell syndrome" - resetare a osmostatului hipotalamic în afecţiuni cerebrale severe (tumori, traumatisme).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 2.X. Etiologia şi aspecte clinice caracteristice excesului de sodiu

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
• Aport excesiv • Administrare i. v. de $Na^+HCO_3^-$ la bolnavi cu acidoză metabolică • Eliminare renală deficitară • Exces de mineralocorticoizi (aldosteron) în sindromul Conn şi exces de cortizol în sindromul Cushing: apare hipopotasemie şi alcaloză metabolică • Scăderea ratei de filtrare glomerulară în IRA sau IRC	• Edemele apar în zonele cu ţesutul interstiţial lax (pleoape, glezne) • Este necesar diagnosticul diferenţial cu edemele din: o sindromul nefrotic (hipoalbuminemia este cauza acestora), o insuficienţa cardiacă congestivă (presiunea hidrostatică din venule este crescută), o ciroza hepatică cu hipertensiune portală (hipoalbuminemie), o edemele idiopatice.

Tabelul 2.XI. Etiologia şi aspecte clinice caracteristice deficitului de potasiu

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
Aport scăzut sau redistribuţie: • Ingestie scăzută • Migrare intracelulară (în alcaloză metabolică, administrare de insulină, proliferări maligne) **Eliminare crescută:** • Extrarenală, prin sucuri digestive (vomă, diaree), transpiraţii excesive, abuz de purgative • Renală, în faza poliurică a IRA, după tratament diuretic, în acidoză tubulară renală, hiperaldosteronism primar sau secundar, sindromul Cushing.	**Simptomatologie neuromusculară:** • Slăbiciune, hipotonie • Depresie, confuzie **Semne cardiace:** • Tahicardie, aritmii • Modificări ale ECG-ului: ST subdenivelat, T inversat, PR prelungit, undă U hipertrofică. • Potenţează toxicitatea digitalei **Simptomatologie renală** • Poliurie • Polidipsie (datorită scăderii capacităţii de concentrare renală) **Alcaloză metabolică**

c. Hiponatremie cu LEC crescut: în cazul edemelor cardiogene, creşte volumul interstiţial, scade volumul plasmatic, stimulând receptorii de volum şi astfel creşte secreţia de ADH, apa reţinută fiind extravazată însă în spaţiul interstiţial, împreună cu electroliţii.

2.7 Homeostazia potasiului

2.7.1 Distribuţia potasiului în organism

Potasiul este un oligoelement prezent în organism în cantitate de aproximativ 3500 mmol (140 g), distribuţia lui fiind predominent intracelulară, doar 2% fiind repartizat extracelular. Concentraţia potasiului în ser este de 3,5-4,7 mmol/L, mai mare cu 0,2-0,3 mmol/L decât în plasmă (datorită eliberării K^+ din plachete, după formarea cheagului). Potasiul are rol în menţinerea volumului intracelular: 90% se găseşte în formă liberă, 10% este potasiu legat în diverse combinaţii complexe (în special în hematii, ţesutul osos şi nervos).

Concentraţia potasiului extracelular mult mai mică decât cea intracelulară, este un important determinant al potenţialului de membrană al celulelor. Modificările concentraţiei acestui ion (mai ales în spaţiul extracelular) au efecte dramatice asupra excitabilităţii celulare miocardice, nervoase, musculare striate. Tendinţa potasiului este de a trece de la concentraţia mai mare (din celule) spre concentraţia mai mică (în spaţiul extracelular). Gradientul de concentraţie este restabilit în permanenţă de către ATP-aza Na^+/K^+.

2.7.2 Echilibrul potasiului în organism

Aportul alimentar de potasiu este foarte variabil, între 50 şi 100 mmol/zi. O cantitate mare se secretă în tubul digestiv şi este reabsorbit ulterior, iar o cantitate mică se elimină prin fecale şi transpiraţie.

Controlul homeostaziei potasiului extracelular se realizează la nivelul eliminării renale. Zilnic, în urina primară trece 25% din potasiul total al organismului (800 mmol), 67% din potasiul

Tabelul 2.XII. Etiologia şi aspecte clinice caracteristice excesului de potasiu

Cauze	Semne / simptome
Aport excesiv, redistribuţie, artefacte • Administrare de K^+ parenteral (prin transfuzii), oral • Hemoliza probei, separarea necorespunzătoare / tardivă a serului, contaminarea probei • Ieşirea potasiului din celule: leziuni tisulare, acidoză sistemică **Eliminare renală deficitară** 1. Insuficienţă renală acută sau cronică 2. Administrare de blocanţi ai enzimei de conversie a angiotensinei (ACE), care blochează indirect şi sinteza aldosteronului 3. Tratament cu diuretice care economisesc potasiul (blocanţii receptorului de aldosteron) 4. Deficit de mineralocorticoizi	Hiperpotasemia poate cauza moartea fără o simptomatologie evidentă (oprirea cordului, fibrilaţie ventriculară): • Datorită scăderii valorii potenţialului de repaus membranar, scade durata potenţialului de acţiune • Pe ECG apare QRS larg mai ales terminal, cu dispariţia segmentului ST, unda T înaltă şi ascuţită, unda P fiind aplatizată până la dispariţie

filtrat se resoarbe pasiv în tubul contort proximal (în care concentraţia potasiului rămâne aproape similară cu cea din plasmă), 20% se reabsoarbe activ (via cotransport Na-K-2Cl) în ansa Henle (porţiunea groasă, ascendentă), iar eliminarea se reglează prin secreţie activă şi difuzie pasivă la nivelul tubului contort distal, (împreună cu H^+, la schimb cu Na^+) mediată de aldosteron, astfel încât în urina finală ajunge aproximativ 10% din potasiul filtrat (mai mult când dieta este bogată în potasiu). Factorii care influenţează eliminarea de K^+sunt:

- Concentraţia potasiului şi a protonilor în celulele tubulare (de exemplu în acidoza metabolică, scade eliminarea de potasiu, fiind prioritară eliminarea protonilor);
- Capacitatea celulelor tubulare de a elimina protoni (în acidoza tubulară renală de tip I, scade capacitatea de secreţie tubulară a protonilor);
- Cantitatea de sodiu disponibil pentru reabsorbţie în tubul contort distal;
- Concentraţia aldosteronului circulant: aldosteronul stimulează eliminarea potasiului direct şi indirect (prin schimb cu Na^+); secreţia de aldosteron la nivelul corticosuprarenalei este stimulată în mod direct de către hiperkaliemie şi indirect ca răspuns la hipovolemie şi/sau hiponatremie, de către sistemul renină – angiotensină;
- Creşterea ratei de filtrare glomerulară favorizează transferul potasiului în lumenul tubular.
- Capacitatea rinichiului de a conserva K^+ este mai mică decât pentru Na^+ (chiar fără aport, se elimină zilnic 10-20 mmol K^+).

2.7.3 Tulburări ale metabolismului potasiului

Concentraţia serică a potasiului afectează în mod dramatic contractilitatea miocardică: atât hipokaliemia cât şi hiperkaliemia pot fi ameninţătoare de viaţă. Domeniul de „siguranţă fiziologică" este relativ restrâns: concentraţii mai mici de 2,5 mmol/L sau mai mari de 6 mmol/L, sunt periculoase în egală măsură.

2.7.3.1 Hipopotasemia

Deficitul de potasiu în organism apare când aportul este mai mic decât eliminarea (*Tabelul 2.XI).* Hipokaliemia/ hipopotasemia (scăderea potasiului plasmatic), nu este echivalentă cu deficitul de potasiu - ea se poate datora şi unei redistribuţii a potasiului prin intrarea acestuia în celule. Doar 2% din întreaga cantitate a potasiului fiind localizată extracelular (restul - intracelular), factorii care influenţează distribuţia între cele două compartimente au rol esenţial în reglarea potasemiei.

Deficitul îndelungat de potasiu duce la instalarea unei acidoze intracelulare (prin redistribuirea potasiului la schimb cu protonii), însoţită de alcaloză extracelulară şi acidurie paradoxală (cu economisirea potasiului).

Pentru corectarea hipopotasemiei, concentraţia potasiului plasmatic este un indicator slab. În general, o concentraţie sub 3 mmol/L sugerează un deficit de potasiu de aproximativ 300 mmol (de obicei intracelular). După administrarea de potasiu acesta ajunge iniţial extracelular. Nu se administrează cantitate mai mare de 140 mmol/ 24 ore (maximum 20 mmol/oră) şi se monitorizează ECG-ul în timpul tratamentului.

Tabelul 2.XIII. Compoziția unor fluide administrate parenteral

Fluid	Compoziție	Utilizare
„Serul fiziologic" NaCl 0,9%	Na^+:154 mmol/L Cl^-: 154 mmol/L	Pierderi de lichide izotone
Glucoză 5%	Glucoză 278 mmol/L	Pierderi de lichide hipotone *
$NaHCO_3$ 1,26%	Na^+:150 mmol/L HCO_3^-: 150 mmol/L	Acidoze metabolice severe
Soluție Ringer	Na^+:147 mmol/L K^+: 4 mmol/L Ca^{2+}:2,25 mmol/L Cl^-: 156 mmol/L	Înlocuirea pierderilor de lichide în timpul intervențiilor chirurgicale

*Deși soluția este izotonă, datorită preluării și consumării rapide a glucozei de către celule, se poate considera că acționează ca soluție hipotonă

2.7.3.2 Hiperpotasemia

Principalele cauze și aspecte clinice ale hiperpotasemiei sunt amintite în *Tabelul 2.XII.*

Corectarea hiperpotasemiei se poate face prin administrare de calciu gluconic 10%, care antagonizează efectele cardiotoxice și se recomandă tratament intravenos cu glucoză și insulină (în 30 minute se administrează 500 mL de glucoză 20% și 20UI de insulină). La bolnavi în acidoză metabolică profundă, injectarea de 100-200 mL soluție bicarbonat 8,4% (conform BE – vezi Echilibrul acido-bazic) determină o mișcare a protonilor spre spațiul extracelular și a potasiului în interiorul celulelor. La bolnavii cu insuficiență renală acută, în caz de hiperpotasemie (peste 6 mmol/L), se recomandă dializa.

2.8 Homeostazia hidro-electrolitică a pacientului chirurgical

În timpul intervenției chirurgicale se pierd cantități considerabile de lichide prin expunerea mucoaselor, prin transpirație, prin sângele pierdut. De aceea, înainte de orice intervenție chirurgicală, statusul hidro-elecrolitic al organismului trebuie să fie echilibrat. Dacă pacientul are nevoie în urgență de o intervenție chirurgicală, administrarea de lichide parenteral este obligatorie. Determinarea ionogramei, a osmolalității plasmatice, a hemogramei, diurezei, sunt utile în aprecierea statusului hidro-electrolitic și în consecință, a tipului de lichid perfuzabil recomandat (vezi *Tabelul 2. XIII*).

Postoperator, ca urmare a răspunsului metabolic la traumă, are loc retenție de apă (consecința secreției crescute de ADH) și sodiu (datorită stresului). În primele 24 de ore postoperator, de obicei nu se administrează mai mult de 1500 mL lichide (preferabil glucoză 5%), iar suplimentarea potasiului nu este necesară (se eliberează din spațiul intracelular în urma leziunilor chirurgicale). Ulterior, sub monitorizare strânsă a diurezei, drenajelor, aportului de lichide *per os* (dacă intervenția nu s-a făcut la nivelul tubului digestiv) și ionogramei, se pot administra până la 2500 mL/24 ore și se poate suplimenta potasiul (aproximativ 50-60 mmol/zi).

2.9 Prezentări de caz

2.9.1 Deshidratare prin aport insuficient de fluide

Un bărbat de 80 de ani este adus în serviciul de urgență, fiind găsit de vecini pe podeaua locuinței, după ce a suferit un atac ischemic cerebral, fără să se poată clarifica perioada de timp scursă de la eveniment. Pacientul prezintă uscăciune marcată a mucoaselor, scăderea turgorului, oligurie, tahicardie și hipotensiune arterială. Analizele de laborator efectuate în urgență, au oferit următoarele rezultate:

- Na^+: 152 mmol/L
- K^+: 5,3 mmol/L
- HCO_3^-: 30 mmol/L
- Glicemie: 60 mg/dL
- Creatinina serică: 1,15 mg/dL
- Ureea serică: 99 mg/dL
- Hematocrit: 55%
- Hemoglobină: 18 g/dL

Comentariu:

Valoarea crescută a hematocritului și concentrația crescută a electroliților, ureei și hemoglobinei, indică o dezhidratare severă. Administrarea de fluide intravenos (preferabil soluție de glucoză 5%), corectează de obicei deficitul. Reinstalarea diurezei în limite fiziologice (1200-1500 mL/ 24 ore), indică hidratarea corespunzătoare a pacientului.

2.9.2 Deshidratare prin diaree severă

Un copil de un an este adus de părinți în serviciul de gardă de pediatrie, urmare a două zile cu multiple scaune diareice. Copilul are tahicardie și hipotensiune, tegumente și mucoase uscate, iar examinările paraclinice efectuate în regim de urgență au oferit următoarele rezultate:

- Ionograma:
  - o Na^+: 145 mmol/L (normal 135-145 mmol/L)
  - o K^+: 3,3 mmol/L (normal 3,3-5,3 mmol/L)
  - o Cl^-: 106 mmol/L (normal 95-105 mmol/L)
- Creatinina serică: 0,5 mg/dL (normal 0,2-0,9 mg/dL)
- Ureea serică: 39 mg/dL (normal 16-40 mg/dL).

Comentariu:

La copilul mic, diareea - chiar de scurtă durată - poate conduce la dezhidratare severă. Simptomatologia denotă hipovolemie, testele biochimice serice neprezentând modificări semnificative. Administrarea parenterală de lichide (NaCl 0,9%) şi antiseptic intestinal a condus la îmbunătăţirea semnificativă a stării clinice a copilului, după 2 zile.

Atenţie ! La copii, pentru mulţi dintre parametrii sanguini şi urinari, valorile fiziologice sunt diferite de cele ale adultului.

2.9.3 Hipopotasemie prin abuz de diuretice

Pacientă de sex feminin, în vârstă de 68 ani, cu antecedente de hipertensiune arterială, în urmă cu un an a avut un episod de edem pulmonar acut. Tratament recomandat: glicozid digitalic, aspartat de Mg şi K, diuretic de ansă, nitrat vasodilatator, blocant de enzimă de conversie a Angiotensinei. Pacienta a renunţat după o lună la nitrat şi la aspartatul de Mg şi K.

La consultul actual prezintă:

- tegumente şi mucoase palide,
- constipaţie,
- oboseală musculară, tonus muscular diminuat, apatie,
- palpitaţii, puls: 95/minut, tensiunea arterială: 130/75 mmHg,
- concentraţia K seric: 2,8 mmol/L

Comentariu:

Edemul pulmonar acut este cauzat de insuficienţa cardiacă stângă decompensată.

Hipopotasemia se manifestă prin: apatie, slăbiciune musculară, diminuarea activităţii intestinale, tahicardie (creşterea frecvenţei bătăilor cardiace). Hipokalemie apare în sindrom Cushing, diaree şi vărsături foarte abundente, administrare timp îndelungat de diuretice care nu economisesc potasiul (de ex. diureticele de ansă).

2.9.4 Edeme hipoproteinemice

O adolescentă de 15 ani este trimisă de medicul de familie nefrologului, ca urmare a edemelor constate la nivelul feţei şi gleznelor în ultimele 2 săptămâni şi a proteinuriei ++++ (>4,5 g/L) depistate la testarea rapidă (examen sumar de urină cu bandelete). Testarea proteinuriei/24 ore, a demonstrat o eliminare de 7g/24 ore.

Biopsia renală a demonstrat leziuni glomerulare minime. Acestea au condus însă la pierderi însemnate de proteine, iar scăderea presiunii coloid osmotice a plasmei a cauzat edemele. După terapie cu glucocorticoizi, situaţia se remite relativ rapid (în 1-2 săptămâni).

2.9.5 Retenţie electrolitică şi azotată în disfuncţii renale acute

A. Pacient de sex masculin, în vârstă de 36 ani, în urmă cu două săptămâni, a avut o faringită streptococică tratată cu antibiotice de către medicul de familie. La vizita de control prezintă:

- stare generală alterată,
- edeme palpebrale,
- fasciculaţii musculare,
- puls: 45/ minut, tensiunea arterială 150/90 mmHg
- relatează greţuri, inapetenţă, parestezii,
- oligurie, urină de culoare maroniu - roşu.
- Examinările de laborator au arătat: hematurie macroscopică şi microscopică (>50 hematii, MO x 400), proteinurie (1g/L), K seric-5,9 mmol/L, Creatinină serică - 2,3 mg/dL, Uree serică: 80 mg/dL.

Comentariu:

Glomerulonefrita acută este o inflamaţie a parenchimului renal (apare deseori după infecţii respiratorii streptococice), care se caracterizează prin hematurie, proteinurie, oligurie, retenţie azotată şi electrolitică, edeme, creşterea presiunii arteriale. În insuficienţă renală acută creşte potasemia, nivelul creatininei şi ureei serice datorită eliminării deficitare a acestora pe cale urinară.

Hiperpotasemia se însoţeşte de bradicardie, fasciculaţii musculare, parestezii. La valori care depăşesc 8-9 mmol/L există pericolul stopului cardiac. Hiperkaliemia peste valoarea de 5 mmol/L apare cel mai des în *insuficienţa renală.* Potasiul seric creşte şi în *boala Addison* (datorită insuficienţei corticosuprarenale scade secreţia de aldosteron, astfel este diminuată eliminarea renală a potasiului). Hiperkaliemie apare şi în cetoacidoza diabetică (în lipsa insulinei, potasiul nu poate pătrunde în celule), în distrugeri masive de ţesut, în stări de şoc.

B. Un tânăr de 26 de ani care a suferit un accident de motocicletă, este adus la serviciul de urgență în stare de șoc (hipotensiune și tahicardie severe), ca urmare a hemoragiei externe severe, cauzate de o fractură deschisă la nivelul membrului inferior drept. În ciuda realizării hemostazei eficiente și a administrării de sânge și soluții coloide, pacientul prezintă oligurie persistentă la o oră de la ieșirea din sala de operație. Determinând osmolalitatea urinară și sodiul urinar, se poate diferenția oliguria din necroza tubulară acută, de aceea din azotemia prerenală: osmolalitatea < 350 mOsm/kg în insuficiența renală acută și > 500 mOsm/kg, în azotemia prerenală, iar Na urinar > 40 mmol/L în insuficiența renală acută și < 20 mmol/L în azotemia prerenală. În ziua a treia de la internare oliguria persistă, iar concentrația creatininei și ureei serice cresc (3 mg/dL respectiv 135 mg/dL).

Comentariu:

Tânărul a dezvoltat o insuficiență renală acută, prin necroză tubulară acută – consecință a șocului hipovolemic. Hemodializa este singurul remediu în cazul de față, funcția renală fiind reluată după două săptămâni, prin așa-numita fază poliurică (funcția glomerulară se reia înaintea funcției tubulare).

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.316-332.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleşca-Manea Luminița – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică,* 1998, p. 323-352.
4. Guyton A. C. – *Textbook of Medical Physiology,* Ed. 7, W.B.Saunders Company, 1986, p. 347-451.
5. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991.
6. Kaplan A.L., Pesce J.A. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984, p. 363-386, p. 1044-1078.
7. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996, p. 73-97.
8. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry,* Ed.5, Mosby, 2004, p.13-39.
9. Mayne P.D. – *Clinical Chemistry in diagnosis and treatment,* Ed 6., Arnold, 1994, p.25-78.
10. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine,* Williams & Wilkins, 1994, p. 331-354.
11. Mihele Denisa – *Biochimie Clinică,* Ed. Medicală, 2001, p.42-49.
12. Nelson D., Cox M. – *Lehninger Principles of Biochemistry,* Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005, p. 47-74.
13. Pagana Kathleen, Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 414-418, 471-474.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 3.
Homeostazia calciului, fosforului şi magneziului

Minodora Dobreanu

Calciul, fosforul şi magneziul sunt constituenţi importanţi ai osului, metabolismul lor interferând. Calciul este cel mai abundent mineral, organismul unui adult conţinând aproximativ 25000 mmol de calciu, echivalent cu 1-1,5 kg, ceea ce reprezintă 2% din masa corporală. Din această cantitate 98-99% se găseşte în oase şi dinţi, restul în ţesuturile moi şi lichidul extracelular (LEC). Lichidul extracelular conţine aproximativ 20-22 mmol de calciu, iar în plasmă concentraţia calciului total este de 2,2-2,5 mmol/L. În oase calciul are un important rol structural (de rezistenţă), găsindu-se sub formă de cristale de hidroxiapatită: $[Ca_{10}(PO_4)_6](OH)_2$, depuse în matricea proteică a osului. Structura proteică a osului este alcătuită în proporţie de 90% din fibre de colagen de tip I, orientate astfel încât au densitate maximă posibilă pe unitate de volum. Prin modificări post translaţionale, în şi între fibrilele de colagen apar legături încrucişate piridinolinice şi pirolice, cu rol major în consolidarea şi mineralizarea matricei proteice. Această microarhitectură permite osului să funcţioneze ca un veritabil rezervor de calciu al organismului.

3.1 Homeostazia calciului

Calciul din oase nu este inert din punct de vedere metabolic: 1% se găseşte în schimb continuu cu LEC, iar anual se remodelează 20% din calciul scheletic sub acţiunea osteoclastelor (celule care descompun ţesutul osos) şi a osteoblastelor (celule care formează ţesut osos), fosfataza alcalină fiind o măsură a activităţii osteoblastelor. La adult există un echilibru între acţiunea resorbtivă a osteoclastelor şi activitatea neoformatoare a osteoblastelor.

Funcţiile calciului în ţesuturile moi:

- Intervine în excitabilitatea neuro-musculară: contracţie musculară, motilitate celulară, exo- şi endocitoză.
- Este cofactor pentru mai mulţi factori ai coagulării.
- Are rol de mesager secund intracelular pentru mulţi mediatori hormonali, prin interacţiunea cu proteine care leagă Ca^{2+}: calmodulina (proteină cu 148 aminoacizi, care poate lega 4 ioni de calciu), troponina C, calbindin D.

Calciul îşi poate îndeplini funcţiile în excitabilitatea neuromusculară şi cea de mesager secund datorită gradientului de concentraţie de aproximativ 10^4 mol/L existent între mediul intra- şi extracelular (10^{-7} mol/L în citoplasmă, respectiv 10^{-3} mol/L extracelular) sau chiar mai mare – de 10^6 mol/L – între citosol şi depozitele intracelulare (mitocondriile şi reticulul endoplasmic neted).

Calciul plasmatic există în mai multe forme: 45% este legat de proteine (din care 80% de albumine şi 20% de gamaglobuline), 7% este fixat pe citrat, fosfaţi, bicarbonat, iar 48% reprezintă calciul ionic (metabolic-fiziologic activ). Ultimele două forme alcătuiesc împreună calciul difuzibil.

În alcaloze protonii se eliberează de pe albumine şi calciul ionic se fixează în locul lor, astfel scade nivelul calciului ionic şi creşte cantitatea de calciu legat, fără să se modifice calciul total. În acidoze, protonii fiind în exces, eliberează calciul de pe albumină, astfel creşte nivelul calciului ionic.

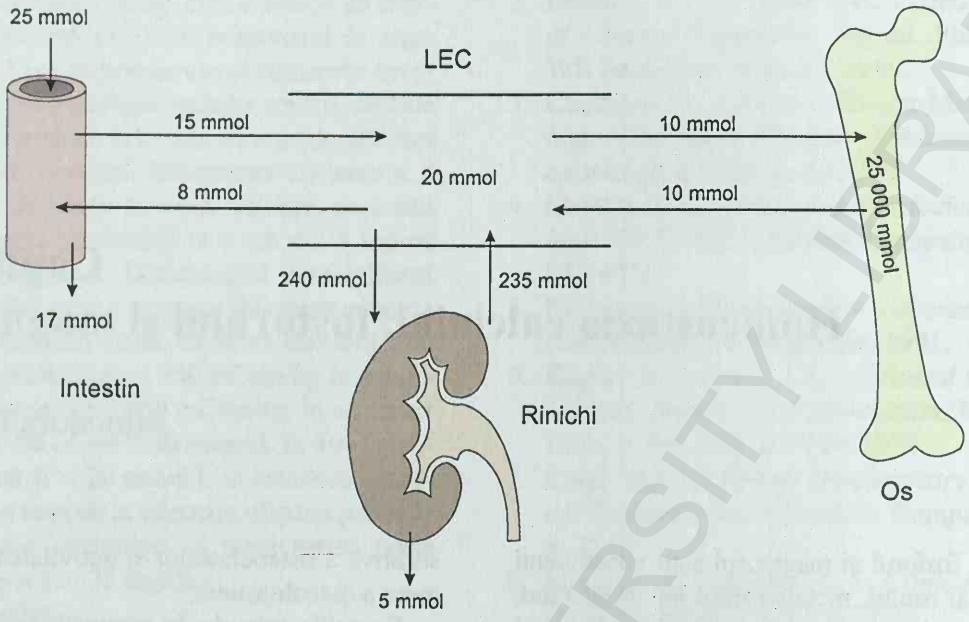


Figura 3.1. Homeostazia calciului in organism

Cantitatea de albumină plasmatică influenţează nivelul calciului total. O hipo- sau hiperalbuminemie semnificativă sau chiar o hiperalbuminemie aparentă (datorită stazei venoase cauzată de garou) pot determina false modificări ale calcemiei; de aceea este nevoie să se introducă o corecţie în funcţie de concentraţia de albumină:

$$[Calciu]_{corectat} = [Calciu]_{determinat} + 0{,}02\ (40 - [Albumină])$$

De asemenea, în mielomul multiplu creşterea fracţiunii gamaglobulinelor produce o falsă creştere a concentraţiei calciului (deşi gama globulinele leagă calciul în mai mică măsură).

3.2 Mecanisme implicate în homeostazia fosfo-calcică

Din cantitatea medie de 25 mmol de calciu ingerat zilnic prin alimentaţie: 12 mmol se absoarbe, 6 mmol se secretă în sucurile digestive, iar 20 mmol se elimină prin fecale. 240 mmol de calciu se filtrează zilnic la nivel renal, din care majoritatea (235 mmol/zi) se reabsorbe şi 5 mmol se elimină (*Figura 3.1*).

Scăderea calcemiei libere (concentraţia plasmatică a calciului ionic) este parametrul care declanşează mecanismele de recuperare/ reabsorbţie a calciului la nivelul organelor cheie în reglarea calcemiei (osul, rinichiul şi indirect intestinul subţire).

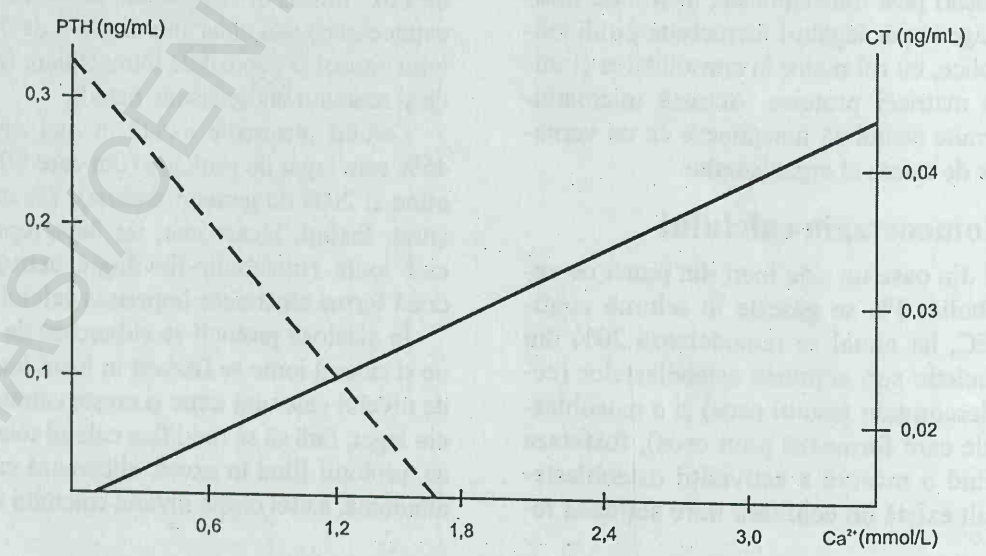


Figura 3.2. Influenţa calcemiei asupra concentraţiei serice a parathormonului şi calcitoninei

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celulele principale paratiroidiene, celulele tiroidiene de tip C şi celulele tubulare renale, dispun de receptori sensibili la concentraţia calciului ionic (CaSR – Calcium -Sensing Receptor), cuplaţi cu sistemul proteinelor G.

3.2.1 Hormonul paratiroidian

Secreţia parathormonului (PTH) este dependentă de concentraţiile calciului şi magneziului. Scăderea concentraţiei calciului stimulează eliberarea şi sinteza acestui hormon (*Figura 3.2*). PTH-ul se sintetizează sub forma unui precursor inactiv numit preproPTH care conţine 115 aminoacizi. Prin pierderea unei secvenţe de 25 aminoacizi se formează proPTH, acesta fiind de asemenea un intermediar fără activitate hormonală. Prin eliminarea a încă 6 aminoacizi, proPTH-ul dă naştere PTH-ului activ, cu 84 de aminoacizi în moleculă – centrul activ fiind în regiunea aminoterminală.

Timpul de înjumătăţire al hormonului este de 5-10 minute. Inactivarea se realizează la nivel hepatic şi renal, proces prin care este îndepărtat de la capătul NH_2-terminal un segment de 34 de aminoacizi. PTH-ul acţionează la nivelul a trei ţesuturi şi organe (*Figura 3.3*):

- Ţesutul osos: la acest nivel are loc eliberarea rapidă a calciului din depozitul labil. Osteoclastele nu au receptori specifici pentru PTH; hormonul se leagă de un receptor „capcană" (osteoprotegerina - OPG) de pe suprafaţa osteoblastelor, care declanşează sinteza RANKL (ligandul receptorului activatorului factorului nuclear kB); acest ligand se va fixa pe RANK (receptorul activatorului factorului nuclear kB), prezent pe precursorii osteoclastelor, declanşând fuzionarea acestora în osteoclaste mature (celule gigante, multinucleate).
- Rinichi: are ca efect creşterea reabsorbţiei calciului şi scăderea reabsorbţiei de fosfat şi bicarbonat, totodată PTH-ul intervine în activarea vitaminei D prin stimularea 1α-hidroxilazei renale, care are ca substrat 25-hidroxi-colecalciferolul (previtamina D).
- Intestin: creşte absorbţia de calciu şi fosfat sub acţiunea vitaminei D (1α-hidroxilarea în rinichi a previtaminei D este stimulată de PTH indirect, prin scăderea nivelului seric al fosfatului).

Secreţia PTH-ului este stimulată de hipomagneziemia uşoară, dar o hipomagneziemie severă scade secreţia de PTH, acest proces fiind magneziu-dependent.

3.2.2 Calcitriolul (vitamina D_3)

Colecalciferolul – precursorul vitaminei D_3 are origine exogenă şi / sau se formează în piele (în straturile bazal şi spinos ale dermului) sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete (un domeniu relativ restrâns de lungimi de undă este optim pentru procesul de izomerizare: 295-300 nm, mai exact 297 nm).

În procesul de activare a provitaminei, au loc două hidroxilări consecutive: 25-hidroxilarea hepatică are loc fără reglare feedback, în schimb 1α-hidroxilarea renală (în tubul contort proximal) este reglată prin feed-back negativ de către produsul final activ (calcitriolul). 1α-hidroxilaza renală

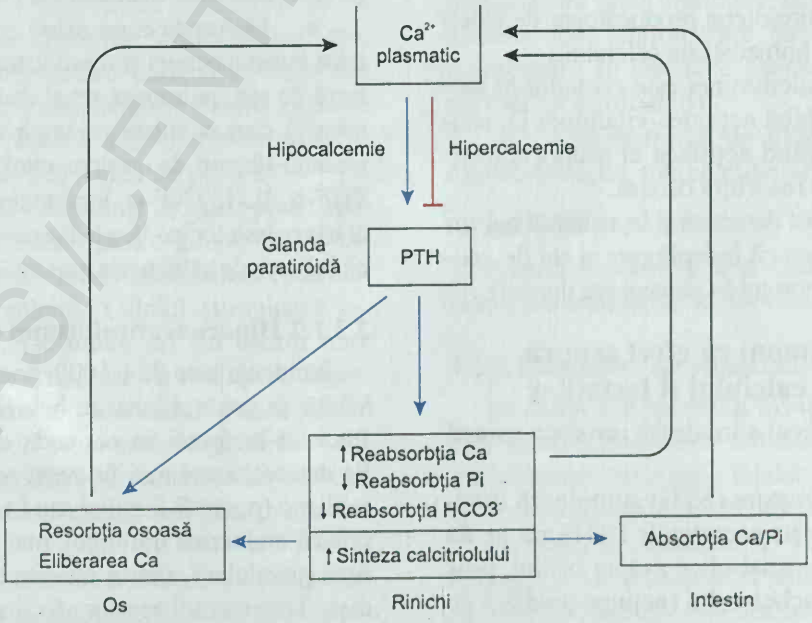


Figura 3.3. Controlul hormonal al metabolismului calciului

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

este stimulată în mod direct de hipofosfatemie şi indirect de PTH, prolactină, estrogeni şi STH.

Vitamina D şi precursorii acesteia se transportă în ser spre organele ţintă, fixată pe suprafaţa globulinei transportoare de vitamină D (DBP).

Vitamina D acţionează ca un veritabil hormon liposolubil, la nivelul a două ţesuturi:

- Intestin (se leagă de un receptor intranuclear VDR, care se comportă ca un factor de transcriere - modulator al expresiei unor gene): creşte absorbţia calciului şi fosfatului alimentar datorită inducerii în enterocite a sintezei unei proteine transportoare de calciu (Calbindin D).
- Ţesutul osos: favorizează mineralizarea osoasă indirect, prin menţinerea unei concentraţii crescute de calciu în lichidul extracelular. Intrarea calcitriolului în osteoblaste creşte producerea de fosfatază alcalină şi osteocalcină (cea mai abundentă proteină Gla matriceală osoasă, MGP noncolagenică, bogată în acid gama-carboxil glutamic). Creşterea foarte marcată a concentraţiei vitaminei D_3 (din intoxicaţiile cu vitamina D) favorizează resorbţia osoasă osteoclastică.

3.2.3 Calcitonina (CT)

Calcitonina este un hormon oligopeptidic, alcătuit din 32 resturi de aminoacizi, produs de celulele C tiroidiene (parafoliculare) ca răspuns la hipercalcemie; principalul efect este inhibarea activităţii osteoclastelor (resorbţia osoasă). Existenţa şi acţiunea acestui hormon nu sunt însă vitale: tiroidectomia şi scăderea consecutivă a nivelului calcitoninei nu provoacă vreun sindrom de deficienţă calcitonină, iar tumorile tiroidiene producătoare de calcitonină nu perturbă homeostazia calciului.

Concentraţia calcitoninei este crescută în sarcină şi lactaţie, inhibă acţiunea vitaminei D_3 asupra osului, favorizând acţiunea ei asupra intestinului, astfel scade resorbţia osoasă.

Calcitonina a fost detectată şi în sistemul nervos central; se presupune că îndeplineşte şi rol de neurotransmiţător (important în perceperea durerii).

3.2.4 Alţi hormoni cu efect asupra metabolismului calciului şi fosfaţilor

Hormonii tiroidieni stimulează resorbţia osoasă osteoclastică.

Hormonul de creştere (STH) stimulează funcţia paratiroidei (creşte secreţia de PTH), iar pe de altă parte are efecte anabolice asupra osului, promovând creşterea scheletului (acţiune mediată de factorii de creştere Insulin-like: IGF-I şi IGF-II) (*v. Capitolul 15*).

Estrogenii şi androgenii favorizează formarea matricei proteice a osului, stimulând activitatea osteoblastelor.

Glucocorticoizii au efect hipocalcemiant, inhibând efectele PTH; dozele mari de cortizon însă, inhibă formarea matricei proteice osoase (perturbă osteogeneza).

3.3 Tulburările metabolismului calciului şi fosfatului

3.3.1 Hipercalcemia

Cele mai frecvente cauze ale hipercalcemiei sunt hiperparatiroidismul primar şi tumorile maligne (asocierea hipercalcemiei în transformările maligne este un semn de prognostic nefavorabil). Cauze mai puţin frecvente sunt tireotoxicoza, intoxicaţia cu vitamina D, tratamentul cu tiazide, sarcoidoza, hipercalcemia hipocalciurică idiopatică, restul cauzelor enumerate fiind rar întâlnite (*Tabelul 3.I*).

3.3.1.1 Afecţiuni maligne

- Non-metastatice: hipercalcemia se datorează eliberării de către tumori a unor peptide similare funcţional cu PTH; de exemplu în carcinomul bronşic cu celule scuamoase: PTHrP – PTH related Protein – peptid cu capătul amino-terminal similar cu PTH (cu rol în metabolismul fiziologic fosfo-calcic al fătului), la adult apare o derepresie a genei codificatoare); în mielomul multiplu, datorită unor citokine care activează osteoclastele (IL-1 şi TNF-α).
- Metastatice: nu există corelaţie între severitatea hipercalcemiei şi masivitatea metastazelor (cancerul de sân, pulmonar, renal dau frecvent metastaze osoase), ceea ce sugerează implicarea şi a unor factori umorali (factori de creştere, citokine, prostaglandine: TGF-α, IL-1, TNF-α, limfotoxina, PGE2) activatori ai osteoclastelor, pe lângă disocierea/ mobilizarea calciului osos de către masa tumorală.

3.3.1.2 Hiperparatiroidismul primar

Incidenţa este de 1:1000, poate să apară la orice vârstă şi poate afecta ambele sexe, dar este mai frecvent la femei în perioada de postmenopauză. Se datorează cel mai frecvent adenoamelor paratiroidiene (poate fi familial sau în contextul unor neoplazii endocrine multiple), mai rar hiperplaziei difuze glandulare, foarte rar carcinomului paratiroidian. Tratamentul acestor afecţiuni este chirurgical.

Tabelul 3.I. Cauzele şi aspectele clinice ale hipercalcemiei

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
• Hiperparatiroidism: primar sau în cazul unor tumori maligne (cu sau fără metastaze osoase) • Hipervitaminoză D: intoxicaţie cu vitamină D, tuberculoză, sarcoidoză • Creşterea turnoverului osos: tireotoxicoza, tratament diuretic (tiazidice), imobilizare (mai ales în boala Paget), tratament cu litiu • Alte cauze: hipercalcemia hipocalciurică idiopatică, sindromul "lapte – alcaline", faza diuretică a insuficienţei renale acute.	• Slăbiciune generală şi musculară, dureri osoase • Scădere în greutate, anorexie, vomă, constipaţie • Modificări mentale: scăderea capacităţii de concentrare, modificarea personalităţii, comă • Dureri abdominale, rar ulcer peptic şi pancreatită • Poliurie, deshidratare • Calculi renali, nefrocalcinoză, calcificări corneene şi vasculare • Aritmii cardiace şi HTA, scurtarea QT la concentraţii peste 3 mmol/L

3.3.1.3 Hiperparatiroidismul secundar şi terţiar

Apare la bolnavii cu deficienţă de vitamină D sau cu afecţiuni renale cronice (scade sinteza calcitriolului), ceea ce duce la hipocalcemie şi la hiperparatiroidism secundar. Creşterea secreţiei de PTH nu normalizează întotdeauna concentraţia calciului seric (de exemplu în hipovitaminoze D severe, există o rezistenţă a mobilizării osoase a calciului de către PTH), consecinţa fiind o hipertrofie a glandei paratiroidiene. Când hipersecreţia de PTH persistă şi după rezolvarea cauzei aceasta determină hiperparatiroidismul terţiar.

3.3.1.4 Alte cauze de hipercalcemie

Tireotoxicoza poate determina o creştere a activităţii osteoclastice.

Administrarea excesivă de vitamina D se poate solda cu hipercalcemie, pericolul este mai mare în cazul administrării unor doze mari sub forma injecţiilor intramusculare. Pentru evitarea supradozării, se preferă administrarea orală a unor doze mai mici sub formă de picături.

Sindromul lapte - substanţe alcaline poate apărea la persoanele cu ulcer gastro-duodenal, datorită dietei sau administrării de neutralizante ale acidităţii (săruri de calciu). Calciul stimulează secreţia de gastrină. De multe ori (în cadrul unor sindroame endocrine neoplazice multiple), hiperparatiroidismul primar (adenomul paratiroidian) se asociază cu tumori secretante de gastrină.

Diureticele tiazidice stimulează reabsorbţia calciului. Tratamentul cronic cu litiu creşte secreţia de PTH.

La 10% dintre bolnavii cu sarcoidoză şi tuberculoză hipercalcemia se datorează 1α-hidroxilării excesive a vitaminei D în ţesutul granulomatos. Procesul este inhibat de tratamentul cu corticosteroizi.

În imobilizările prelungite scad stimulii mecanici ai neoformării osoase, resorbţia osoasă (care are loc obişnuit) va duce astfel la demineralizări.

3.3.1.5 Tratamentul în hipercalcemie

- Creşterea diurezei - furosemidul stimulează eliminarea renală a calciului inhibând reabsorbţia tubulară; se administrează lichide intravenos;
- Paratiroidectomia se practică în cazul tumorilor paratiroidei;
- Administrarea de calcitonină inhibă resorbţia osoasă;
- Administrarea de bisfosfonaţi – în special în hipercalcemia asociată transformărilor maligne; au efect inhibitor asupra osteoclastelor imediat după administrare, dar şi ulterior datorită incorporării în matricea osoasă (în locul ocupat normal de pirofosfaţi);
- Administrarea de glucocorticoizi în tumorile maligne, inhibă eliberarea calciului.

3.3.2 Hipocalcemia

Aspectele etiologice şi clinice ale hipocalcemiei sunt enumerate în *Tabelul 3.II.*

3.3.2.1 Deficitul de vitamină D

Se datorează aportului insuficient, malabsorbţiei, sintezei endogene cutanate insuficiente sau transformării endogene inadecvate (este compromisă activarea prin hidroxilări).

Deficitul de vitamină D cauzează rahitismul la copil şi osteomalacia la adult, se materializează prin insuficienta mineralizare a osului, având

Tabelul 3.II. Cauzele şi aspectele clinice ale hipocalcemiei

Cauze	Aspecte clinice şi paraclinice
• Artefacte • Recoltare incorectă, pe EDTA sau alţi chelatori • Deficit de vitamina D • Aport alimentar scăzut sau malabsorbţie • Neexpunere la soare • Tulburări ale metabolismului vitaminei D • Insuficienţă renală • Terapie cu anticonvulsivante (fenitoin) • Deficit de 1α-hidroxilază • Hipoparatiroidism • Pseudohipoparatiroidism • Deficit sever de magneziu • Hiperfosfatemie • Pancreatită acută • Transfuzie masivă cu sânge citratat • Hipocalcemia neonatală	• Tulburări de comportament • Obnubilare, parestezie • Crampe şi spasme musculare (semnele Chvostek şi Trousseau) • Convulsii • Stridor laringeal • Cataractă (hipocalcemie cronică) • Calcifierea ganglionilor bazali • Creşterea intervalului QT pe ECG

drept consecinţă deformarea osului (la copil) şi demineralizări în benzi ale oaselor pelvisului, femurului, scapulei (la adult).

3.3.2.2 Afecţiuni renale (Osteodistrofia Renală)

Hipocalcemia este comună în stadiile finale ale afecţiunilor renale datorită sintezei insuficiente de calcitriol. Hipocalcemia poate determina hiperparatiroidism secundar. Persistenţa unei secreţii crescute de PTH după rezolvarea problemei renale se numeşte hiperparatiroidism terţiar.

3.3.2.3 Hipoparatiroidismul

Cauza acestuia poate fi:

- congenitală: asociat cu deficite imune - sindromul di George (aplazia timusului şi deficit de limfocite T);
- dobândită: idiopatic, autoimun, chirurgical, hemocromatoza;
- pseudohipoparatiroidismul este o formă de hipoparatiroidism cu manifestări clinice, dar cu valori plasmatice normale ale PTH. Cauza acestuia este deficienţa de receptori pentru PTH sau deficitul de AMPc, mesagerul secund intracelular al PTH-ului, datorită scăderii activităţii adenilat ciclazei (enzimă care este cuplată/ activată de sistemul proteinelor G).

3.3.2.4 Deficitul de magneziu

Deficitul de magneziu poate cauza hipocalcemie datorită faptului că magneziul este necesar glandei paratiroide pentru sinteza de PTH. În acest caz, pacientul va fi "rezistent" (fără răspuns) la tratamentul cu vitamina D sau la administrarea de calciu.

3.3.2.5 Pancreatita acută

Activarea lipazei pancreatice în cavitatea peritoneală eliberează acizi graşi liberi care împreună cu calciu formează săpunuri insolubile de calciu pe peritoneu, cauzând, astfel, hipocalcemie.

3.3.3 Homeostazia fosfaţilor

Organismul uman conţine aproximativ 25000 mmol de fosfaţi, din care 80% se află în oase, 15% se găseşte intracelular (este principalul anion intracelular) şi doar 0,1% în lichidul extracelular. Concentraţia plasmatică a fosfaţilor se situează între 0,8-1,4 mmol/L, din care 15% sunt legaţi de proteine şi 85% sunt în stare liberă. Aportul alimentar de fosfat este de 1 g/zi. Concentraţia plasmatică a fosfaţilor este importantă în reglarea homeostaziei acestora şi a homeostaziei calciului în organism.

3.3.3.1 Hiperfosfatemia – cauze:

- Insuficienţă renală;
- Hipoparatiroidism / Pseudohipoparatiroidism;
- Acromegalie;
- Intoxicaţie cu vitamina D;
- Administrare excesivă de fosfaţi;
- Status catabolic (comă cetoacidotică).

Consecinţa hiperfosfatemiei este inhibarea 1α-hidroxilazei renale şi astfel represia activării

Tabelul 3.III. Modificarea unor parametri serici în afecţiuni ale sistemului osos

Patologia	Calciul seric	Fosfaţii serici	Fosfataza alc.	Alţi parametri
Osteoporoza	N	N	N	↑ sau N Ca urinar şi HO-Pro, DEXA
Osteomalacia	↓ sau N	↓	↑↑	-
Boala Paget	N (↑*)	N	↑↑↑	-
Osteodistrofia renală	↓ sau N	↑	↑	↑ Creatinina
Hiperparatiroidismul primar	↑	N sau ↓	N sau ↑	↑ PTH
Metastaze osoase	N sau ↑	↓, N sau ↑	↑	-

* *În timpul imobilizării*

vitaminei D, ceea ce duce la scăderea absorbţiei intestinale a calciului şi fosfatului.

Tratamentul se efectuează prin administrare de săruri de magneziu sau aluminiu pentru legarea fosfatului monoacid (HPO_4^{2-}) şi diacid ($H_2PO_4^-$) în intestin, inhibând astfel absorbţia acestora.

3.3.3.2 Hipofosfatemia

Hipofosfatemia se consideră severă la concentraţii serice sub 0,3 mmol/L. Cauze:

- Deficit de vitamină D;
- Hiperparatiroidism primar;
- Cetoacidoză diabetică în faza de revenire;
- Administrare de săruri de magneziu, aluminiu;
- Tratament parenteral cu administrare insuficientă de fosfaţi.

Consecinţa hipofosfatemiei este scăderea disponibilităţii fosfatului pentru sinteza de ATP şi 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG), cel din urmă fiind un important component al hematiilor, cu funcţie esenţială în transportul oxigenului (scade afinitatea hemoglobinei pentru oxigen).

Tratamentul constă în administrarea de fosfaţi, de preferat *per os*, mai rar parenteral (acest mod de administrare este contraindicat la bolnavii cu hipercalcemie şi/sau oligurie).

3.4 Investigarea tulburărilor metabolismului fosfo-calcic

Investigaţiile paraclinice utile în diagnosticul hiper -/ hipocalcemiei:

- Ca şi Pi seric şi urinar;
- PTH seric;
- Activitatea fosfatazei alcaline;
- Mg seric şi urinar;
- vitamina D serică;
- Radiografii osoase;
- Tomografie;
- Rezonanţă magnetică.

În tumorile maligne putem constata creşterea calciului seric şi a fosfatazei alcaline. Radiografiile, tomografia computerizată şi rezonanţa magnetică nucleară confirmă diagnosticul. Hiperparatireoza determină creşterea calcemiei, fosfatemiei şi a nivelului PTH. Terapia cu vitamina D, tiazidice sau litiu, poate indica o supradozare a acestor substanţe ca fiind cauza hipercalcemiei. Nivelul calciului urinar este util în diagnostic doar dacă este scăzut, sugerând hipercalcemie familială hipocalciurică.

3.5 Afecţiuni osoase metabolice

O serie de afecţiuni osoase sunt însoţite de tulburări ale metabolismului osului (*Tabelul 3.III*):

- Osteoporoza;
- Rahitismul şi osteomalacia;
- Boala Paget (Osteita deformantă);
- Osteodistrofia renală;
- Metastaze osoase;
- Hiperparatiroidism primar.

3.5.1 Osteoporoza

Această boală se caracterizează prin scăderea masei ţesutului osos normal mineralizat, datorită unui dezechilibru între resorbţia şi mineralizarea osoasă. Consecinţa cea mai frecventă este apariţia fracturilor la traumatisme minore. Descreşterea progresivă a masei osoase apare fiziologic cu înaintarea în vârstă, datorită scăderii activităţii osteoblastelor (datorită deficitului de estrogeni) şi mai rar a creşterii activităţii osteoclastelor.

Pentru tratamentul osteoporozei la femei postmenopauză, FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) a aprobat peptide analoage structural PTH (1-34), care au un efect anabolic asupra scheletului, dar îmbunătăţesc şi arhitectura acestuia (spre deosebire de agenţii antiresorbtivi).

BCU "VASILE LUPU" LIBRARY

Tabelul 3.IV. Cauzele şi aspectele clinice ale hipomagneziemiei

Cauze	Manifestări clinice
• Deficit alimentar / Malabsorbţie, Diaree / Abuz de alcool • Alimentaţie parenterală fără suplimentare de magneziu • Cauze endocrine: o Hiperaldosteronism o Cetoacidoză diabetică • Terapie cu: diuretice, Amfotericină B, Cisplatin	• Agitaţie / Tremor • Ataxie • Mişcări coreiforme • Convulsii / Delir • Slăbiciune musculară • Tetanie

3.5.1.1 Osteoporoze primare

- Tipul 1 de osteoporoză (post-menopauză) afectează zona trabeculară a osului, ducând frecvent la zdrobiri ale corpurilor vertebrale.
- Tipul 2 de osteoporoză (de senescenţă) afectează zona trabeculară şi corticală a osului şi apar frecvent fracturi de col femural.

3.5.1.2 Osteoporozele secundare

Se întâlnesc în sindromul Cushing, tireotoxicoză, diabet zaharat, hipogonadism, tratamente îndelungate cu anticoagulante injectabile, cu glucocorticoizi, sau în caz de alcoolism, tabagism, consum excesiv de cafea, imobilizare îndelungată, malabsorbţie de calciu, scădere severă în greutate.

Investigaţii utile:

- Ca şi Pi serice sunt în limite normale;
- Fosfataza alcalină plasmatică este normală;
- Ca urinar crescut;
- Hidroxiprolina urinară crescută (datorită distrucţiei matricei osoase organice – colagenul este bogat în hidroxiprolină, HO-Pro).
- Absorbţia de raze X cu energie dublă (Dual energy X-ray absorptiometry - DXA sau DEXA) este considerată standardul de aur în diagnosticul osteoporozei.

3.5.2 Osteomalacia

Constă din scăderea componentei anorganice a osului. Cauza poate fi lipsa vitaminei D (la copii cauzează **rahitismul**). Se constată dureri osoase, deformări osoase, hipocalcemie, hipofosfatemie şi hiperparatireoză secundară hipocalcemiei.

3.5.3 Boala Paget (osteită deformantă)

Se caracterizează prin coexistenţa proceselor de osificare şi osteoliză intensă. Se constată deformări ale oaselor lungi (curbarea tibiei, femurului), cifoză dorsală, creşterea calotei craniene. Radiologic se evidenţiază focare de osificare şi de osteoliză (ultimele mai ales la oasele craniului). Osteoliza se datorează intensificării activităţii osteoclastelor. Nivelul fosfatazei alcaline creşte datorită intensificării activităţii osteoblastelor. Calciul şi fosfatul anorganic sunt în limite normale pentru că formarea şi distrugerea osului sunt intensificate în egală măsură.

3.6 Homeostazia magneziului

Magneziul este al patrulea cation al organismului, din punct de vedere cantitativ. Organismul uman conţine aproximativ 1000 mmoli de magneziu din care 50% se află în ţesutul osos, iar restul este egal repartizat între ţesutul muscular (25%) şi alte ţesuturi moi (25%). Cantitatea de magneziu în lichidul extracelular este de 15-30 mmol, iar concentraţia magneziului seric este 0,7-1,4 mmol/L.

Aportul de magneziu este variabil (10-12 mmol/zi), din acesta 2-4 mmol se pierd prin fecale, restul se absoarbe la nivelul intestinului subţire. 8 mmol/zi sunt eliminaţi la nivel renal sub controlul PTH-ului, care stimulează direct reabsorbţia de magneziu. Aldosteronul stimulează indirect eliminarea magneziului prin creşterea volumului lichidului extracelular.

3.6.1 Rolul biologic al magneziului:

- este activator pentru multiple sisteme enzimatice (300-400 enzime);
- ajută la adaptarea / fixarea unor substrate în centrele active ale enzimelor (ATP în cazul kinazelor);
- intervine în transportul ionilor prin membrane (Mg însoţeşte K în mişcările prin membranele celulare în ţesuturile moi şi însoţeşte Ca în mişcările spre / dinspre ţesutul osos); scăderea magneziului extracelular creşte excitabilitatea neuromusculară;
- are rol în păstrarea integrităţii structurale a acizilor nucleici, proteinelor, ribozomilor.

3.6.2 Hipermagneziemia

La valori peste 2,5-5 mmol/L duce la tulburări de ritm cardiac, peste 7,5 mmol/L poate apare paralizia muşchilor respiratori cu stop cardiorespirator. Valori foarte crescute ale magneziului apar de obicei la bolnavii cu insuficienţă renală. Administrarea intravenoasă de calciu contracarează pentru scurt timp efectele hipermagneziemiei, dar rezolvarea pe termen lung se face prin dializă (în insuficienţă renală).

3.6.3 Hipomagneziemia

Este mai frecventă în practica medicală decât hipermagneziemia. *Tabelul 3.IV* prezintă principalele cauze şi manifestări clinice ale hipomagneziemiei.

3.7 Prezentări de caz

3.7.1 Osteoporoza

O femeie de 63 de ani se internează în spital datorită unei dureri acute apărute la nivelul coloanei vertebrale, în regiunea interscapulară, după un accident casnic. Radiografia detectează două fracturi la nivelul vertebrelor cervicale şi demineralizare generalizată a întregului schelet. Persoana se află la menopauză de 20 de ani după histerectomie, fără să tolereze însă terapia de substituţie hormonală. Investigaţiile de laborator au fost în limite normale, în totalitate.

Comentariu:

Simptomatologia de osteoporoză apare relativ tardiv (în faze avansate ale bolii) şi cel mai adesea debutează cu fracturi (de col femural şi vertebrale sunt cele mai frecvente). Terapia de substituţie hormonală este o soluţie pentru această categorie de persoane.

3.7.2 Hiperparatiroidism primar

O femeie de 52 ani, se adresează în serviciul de urgenţă cu o durere acută, cu caracter colicativ, în regiunea lombară. Investigaţiile de urgenţă au arătat:

- Hematurie: +++
- Ca seric: 3,1 mmol/L
- Fosfatul seric: 0,65 mmol/L
- Na: 145 mmol/L
- K: 4 mmol/L
- Cl: 115 mmol/L
- HCO_3^-: 17 mmol/L
- PTH: 16,7 pmol/L (normal: 1,1-6,9 pmol/L)
- Rx – litiază renală

Comentariu:

Hipercalcemia descoperită accidental se datorează cel mai adesea unui hiperparatiroidism primar (cel mai adesea în contextul unor adenoame paratiroidiene): hipercalcemia, hipofosfatemia şi acidoza metabolică cu lacună anionică normală (datorită efectului compensator al clorurii). Concentraţia PTH clarifică diagnosticul: valorile crescute ale calcemiei suprimă în mod normal producerea de PTH - cu excepţia hiperparatiroidismului primar.

3.7.3 Hipercalcemie asociată cu proliferări maligne

Pacientă de sex feminin, 48 ani, relatează apariţia în urmă cu aproximativ 2 ani a unui nodul de consistenţă dură, nedureroasă în sectorul supero-lateral al sânului drept. Formaţiunea a crescut lent în volum. Actualmente se observă o modificare a tegumentului şi senzaţie de disconfort în regiunea supero-laterală a sânului, dureri la nivelul coloanei vertebrale. La examenul obiectiv se constată o retracţie mamelonară, semnul cojii de portocală la nivelul pielii, ganglioni limfatici axilari măriţi în volum. Se palpează o formaţiune dură, aderentă la piele, de aproximativ 3/4 cm în segmentul supero-lateral.

Concentraţia calciului seric total este 2,9 mmol/L; radiografia de coloană dorsală: focare multiple de osteoliză.

Comentariu:

Hipercalcemia constatată la această pacientă, însoţită de rarefierea osoasă, se datorează metastazelor osoase secundare proliferării maligne la nivelul glandei mamare.

3.7.4 Hipoparatiroidism secundar

Unei paciente de sex feminin, în vârstă de 57 ani, i se pune diagnosticul de cataractă în serviciul de oftalmologie. În urmă cu 10 ani femeia a suferit o tiroidectomie pentru o guşă multinodulară. Investigaţiile paraclinice de rutină efectuate în clinica de oftalmologie, au arătat:

- Ca seric: 1,8 mmol/L
- Fosfatul seric: 2,85 mmol/L
- Fosfataza alcalină: 70 U/L

Clinic se constată spasme/crampe musculare (semnele Trousseau şi Chvostek sunt prezente).

Comentariu:

Combinaţia hipocalcemie-hiperfosfatemie-fosfatază alcalină normală, este tipică hipoparatiroidismului; la această pacientă, probabil cauza este extirparea chirurgicală a gladelor paratiroide în intervenţia pe tiroidă.

Cataracta este o complicaţie recunoscută a hipoparatiroidismului, probabil datorită faptului că hiperfosfatemia conduce la precipitarea sub formă de săruri cu calciu, la nivelul cristalinului.

3.7.5 Osteomalacie

Pacientă de 61 ani, cu deficienţe de auz, nu şi-a părăsit locuinţa în ultimii trei ani. Prezintă de aproximativ 2 luni dureri ale coloanei vertebrale, pelvisului şi la nivelul cutiei toracice, acuzele accentuându-se în ultimele zile. La examenul obiectiv se constată tegumente şi mucoase palide, ţesut adipos slab reprezentat, mers clătinat, nesigur, cutia toracică sensibilă la palpare şi percuţie. Radiografiile de cutie toracică au evidenţiat o fractură costală, dar şi accentuate demineralizări în benzi ale ţesutului osos. Examinările de laborator:

- Ca seric: 2,0 mmol/L
- Fosfatul seric: 0,55 mmol/L
- Fosfataza alcalină: 310 U/L
- Vitamina D_3: 30 pmol/L (normal 75 - 175 pmol/L)
- PTH: 10 pmol/L (normal 1,1 - 6,9 pmol/L)

În ciuda suplimentării calciului şi vitaminei D, rămâne hipocalcemică în următoarele 3 săptămâni.

Comentariu:

În formele severe de osteomalacie, modificările biochimice sunt caracteristice: hipocalcemie, hipofosfatemie, creşterea fosfatazei alcaline şi a PTH, secundare deficitului de vitamină D. Hipocalcemia persistentă în ciuda administrării vitaminei D se poate datora hipomagneziemiei: dozarea magneziului seric la pacientă, a evidenţiat o concentraţie de 0,39 mmol/L. Suplimentarea magneziului a condus la o normalizare rapidă a celorlalţi parametri.

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.345-358.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleşca-Manea Luminiţa – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică,* 1998, p. 265-293.
4. Kaplan A.L., Pesce J.A. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984, p. 439-459.
5. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996, p. 134-146.
6. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry,* Ed.5, Mosby, 2004, p.219-236, p.171-193.
7. Mayne P.D. – *Clinical Chemistry in diagnosis and treatment,* Ed 6., Arnold, 1994.
8. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine,* Williams & Wilkins, 1994, p. 387-399.
9. Pagana Kathleen, Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 151-157, 399-401.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 4.
Echilibrul acido-bazic al organismului

Minodora Dobreanu

Procesele biologice şi reacţiile enzimatice depind de concentraţia protonilor în mediul de reacţie. Viaţa este posibilă doar în limite restrânse de pH (7 - 7,7 ceea ce înseamnă o concentraţie a protonilor de aproximativ $10^{-7} - 2 \times 10^{-8}$ mol/L). pH-ul lichidelor extracelulare este uşor alcalin, situat în intervalul 7,35-7,45. Având în vedere că procesele metabolice din organism produc zilnic 50-100 mmol de protoni (*Tabelul 4.I*), care trec în lichidul extracelular, ar rezulta o creştere a concentraţiei protonilor cu 2,5-5 mmol/L, ceea ce ar fi incompatibil cu viaţa, având în vedere concentraţia fiziologică a protonilor (aproximativ 40 nmol/L). Aceste schimbări sunt cu atât mai importante cu cât este bine cunoscut faptul că modificările cu câteva zecimale ale valorii optime a acidităţii mediului intern, au consecinţe grave, în special prin modificarea gradului de ionizare al proteinelor (fenomen care afectează profund activitatea enzimelor).

Oxigenul şi dioxidul de carbon sunt substanţe esenţiale ale metabolismului: în timp ce oxigenul este utilizat în lanţul de oxidare biologică pentru formarea apei (cu eliberarea unei cantităţi însemnate de energie: doi sau trei moli de ATP/moleculă de apă formată), dioxidul de carbon rezultă în urma proceselor de decarboxilare; în ţesuturi, dar mai ales în interiorul hematiei, dioxidul de carbon formează cu apa acidul carbonic, care disociază în ioni bicarbonat şi protoni.

4.1 Mecanisme implicate în homeostazia acido-bazică

4.1.1 Procese fiziologice generatoare de protoni (reacţii de dehidrogenare)

Catabolismul incomplet al carbohidraţilor şi acizilor graşi (compuşi cu C, H, O) (*Tabelul 4.I*):

- în anaerobioză glucoza se transformă în acid lactic,

Tabelul 4.I. Substanţe acide produse în organism

Acidul	Sursa	Calea de eliminare	Cantitatea produsă	Concentraţia plasmatică
Dioxidul de carbon	Respiraţia celulară	Pulmonar	20.000 mmol/zi	21-30 mmol/L
Acizi organici:				
Acid lactic	Glicoliza anaerobă	Gluconeogeneză	1.000 mmol/zi	1 mmol/L
Corpi cetonici	Spirala Lynen	Oxidare celulară		1 mmol/L
Acizi anorganici:				
Derivaţi de acid fosforic	Compuşi cu fosfor	Renală	70 mmol/zi	
Derivaţi de acid sulfuric	Aminoacizi cu sulf	Renală		

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- acizii graşi în perioade de flămânzire generează corpi cetonici.

Catabolismul complet al compuşilor organici care conţin şi alte componente decât C, H, O:

- în condiţii aerobe şi completat cu respiraţia celulară, glucoza se transformă în CO_2 şi apă,
- prin spirala Lynen completată cu respiraţia celulară, acizii graşi se transformă în apă şi CO_2,
- aminoacizii (prin gruparea NH_2-) sunt sursa de azot pentru sinteza ureei,
- grupările tiolice se oxidează în sulfaţi.

Ureea şi sulfaţii sunt eliminaţi pe cale renală.

Majoritatea produşilor de degradare metabolici sunt acizi (acidul carbonic, corpii cetonici, acidul lactic, oxalic, uric etc.). În ciuda formării continue a acestor acizi, pH-ul sângelui şi altor lichide biologice, rămâne totuşi neschimbat. Ca urmare, în aceste lichide trebuie să existe şi să funcţioneze nişte sisteme chimice, care pot neutraliza de la moment la moment creşterea concentraţiei H^+ - sistemele tampon (*buffer*).

4.1.2. Procese care menţin constantă concentraţia protonilor în lichidul extracelular

Mecanisme imediate, fizico-chimice: sistemele tampon (sunt doar o măsură temporară).

Mecanisme tardive, biologice:

- funcţia respiratorie (eliminarea de CO_2);
- funcţia renală (pentru eliminarea NH_4^+ şi $H_2PO_4^-$);
- funcţia digestivă (ficatul transformă acidul lactic în piruvat şi din acesta, sintetizează glucoză – gluconeogeneza - care poate fi stocată sub formă de glicogen).

4.1.2.1 Mecanisme fizico-chimice de reglare a echilibrului acido-bazic. Sistemele Tampon

Sunt amestecuri obţinute din acizi sau baze slabe cu sărurile lor cu baze sau acizi tari şi au proprietatea de a se opune variaţiei pH-ului mediului la adăugarea limitată de acizi sau baze:

1. $HA + H_2O \leftrightarrows A^- + H_3O^+$
2. $KA \longrightarrow A^- + K^+$

Rearanjând şi logaritmând expresia matematică a constantei de echilibru a primei ecuaţii, se obţine ecuaţia Henderson - Hasselbalch pentru sistemele tampon:

$$k = \frac{[A^-]\cdot[H_3O^+]}{[H_2O]\cdot[HA]},$$

$$k\cdot[H_2O] = Ka = \frac{[A^-]\cdot[H_3O^+]}{[HA]};$$

Ka = constanta de aciditate a componentei acide a tamponului.

$$pH = pKa + \lg\frac{[A^-]}{[HA]};$$

$$pH = -\lg[H_3O^+]$$

$$pKa = -\lg Ka$$

Acidul slab şi sarea sa se găsesc concomitent în aceeaşi soluţie; deoarece sarea se găseşte în formă aproape complet disociată (echilibrul reacţiei 2 este „deplasat" la dreapta), conform legii acţiunii maselor echilibrul reacţiei 1 va fi „deplasat" la stânga, sau cu alte cuvinte ecuaţia Henderson - Hasselbach pentru sistemele tampon se poate scrie în forma următoare:

$pH = pKa + \lg\frac{[sare]}{[acid]}$; determinând doi dintre parametrii ecuaţiei, prin calcul poate fi aflat al treilea.

Valoarea de pH a unei soluţii tampon, numită aciditatea actuală, este determinată de raportul cantităţii componentului bazic (sarea acidului slab, formată cu o bază puternică) şi acid. Această valoare rămâne constantă indiferent de cantitatea absolută a componenţilor. Prin modificarea acestui raport, în limita capacităţii de disociere a acidului slab, pot fi alcătuite sisteme de tampon cu valori diferite de pH.

Capacitatea de tamponare (CT) a unui tampon este definită ca fiind numărul de echivalenţi de H^+ sau HO^- care adăugaţi la un litru de tampon modifică pH-ul soluţiei cu 1 unitate; CT este maximă dacă concentraţiile celor doi componenţi ai tamponului sunt egale (la pH-ul soluţiei egal cu pKa); prin diluţie pH-ul soluţiei rămâne acelaşi, CT însă scade; un sistem tampon acţionează optim în intervalul de pH = pKa ± 1.

În organism funcţionează patru sisteme tampon:

- tamponul bicarbonat / acid carbonic (HCO_3^- / H_2CO_3) - $pK_{H2CO3} = 6,1$;
- hemoglobina (HHb/ $KHbO_2$): $pK_{HHb} = 7,3$; $pK_{HbO2} = 7,16$;
- proteinele ($Prot^-$ / HProt);
- tamponul fosfat (HPO_4^{2-}/$H_2PO_4^-$): $pK_{H2PO4^-} = 6,8$;

Primele două sunt tampoane predominant extracelulare, iar ultimele două tamponează mai ales intracelular şi în urină (fosfaţii).

Tamponul bicarbonat / acid carbonic - este cel mai important tampon sanguin, atât prin capacitatea mare de tamponare (asigură ~ 52-55 % din CT a sângelui: 40% în plasmă şi 15% intraeritrocitar), cât şi prin rapiditatea regenerării componentelor sale (CO_2 se elimină respirator, iar HCO_3^- se recuperează şi se neoformează la nivel renal).

Limitele stabilizării acidităţii actuale (capacitatea de tamponare a sistemului), sunt dependente de cantitatea componenţilor. În cazul sistemului tampon bicarbonat / acid carbonic, această dependenţă se explică prin faptul că în soluţie apoasă ambii componenţi disociază electrolitic. Spre deosebire de ionii specifici ai componenţilor (Na^+ din sarea bazică şi H^+ din acidul slab, care determină şi aciditatea actuală a sistemului tampon), ionii de HCO_3^- sunt furnizaţi de ambele substanţe. Dat fiind că bicarbonatul de Na este un electrolit puternic (care disociază 100%) suprimă disocierea acidului carbonic, astfel încât concentraţia actuală a HCO_3^- este determinată de cantitatea sării, iar cea a H^+ este dependentă exclusiv de gradul disociaţiei acidului carbonic în condiţiile existente:

$$NaHCO_3 \longleftrightarrow HCO_3^- + Na^+$$

$$H_2O + CO_2 \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

În cazul acestui sistem tampon, valorile celor doi parametri pot fi calculate în felul următor: conform legii acţiunii maselor (Guldberg-Waage), valoarea raportului produsului concentraţiilor H^+ şi HCO_3^- şi al acidului carbonic nedisociat este constantă.

$$K_a = \frac{[H^+]\cdot[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Din această formulă poate fi exprimată valoarea concentraţiei ionilor de H^+:

$$[H^+] = K_a \cdot \frac{[H_2CO_3]}{[HCO_3^-]}.$$

Deoarece logaritmul negativ al valorilor concentraţiilor H^+ indică valoarea cifrică a pH, prin logaritmarea ecuaţiei de mai sus se poate obţine valoarea acidităţii actuale. Ecuaţia Henderson - Hasselbalch pentru acest sistem tampon:

$$pH = pK_a + \log\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}.$$

Ca urmare, valoarea acidităţii actuale (pH) a unei soluţii tampon poate fi calculată din raportul concentraţiilor componentului bazic şi acid, iar aciditatea titrabilă (capacitatea de tamponare), din suma concentraţiilor acestora.

$$pH = 6{,}1 + \lg\frac{[HCO_3^-]}{pCO_2 \cdot 0{,}03}$$

Concentraţia H_2CO_3 este exprimată prin produsul dintre presiunea parţială a CO_2 (pCO_2 ~ 40 mmHg) şi coeficientul de solubilitate al acestuia în apă (0,03). Cifra 6,1 este valoarea pK_a a acidului carbonic, iar 1,3 este logaritmul raportului de concentraţie bicarbonat / acid carbonic = 24/1,2. Având în vedere faptul că pKa pentru acest tampon este destul de depărtat de pH-ul fiziologic, raportul între componenta metabolică (HCO_3^-) şi cea respiratorie (CO_2) a tamponului în plasmă este 20; deci concentraţia HCO_3^- este 23 - 25 mmol/L.

pH-ul sângelui şi lichidului extracelular depinde de reglarea raportului HCO_3^-/H_2CO_3, reglaj realizat rapid de plămân prin eliberarea CO_2 şi de rinichi, prin eliminarea H^+ (sub formă de NH_4^+ şi $H_2PO_4^-$), reabsorbţia şi neoformarea HCO_3^-.

Hemoglobina asigură ~ 38 % din CT a sângelui, capacitatea sa de tamponare fiind asigurată de grupările polare ale aminoacizilor din structura globinei; este o cromoproteină cu rol tampon important datorită concentraţiei mari pe care o are în sânge, rolului de transportor al gazelor sanguine şi abundenţei histidinei în structura sa ($pK_{His} \cong 7$).

Proteinele plasmatice (altele decât hemoglobina), asigură 5 - 10 % din CT sanguină; proteinele sunt importante mai ales ca tampon intracelular.

Tamponul fosfat este modest reprezentat în sânge (~ 2 % din CT sanguină), dar foarte bine reprezentat intracelular şi în urină.

4.1.2.2 Parametrii echilibrului acido-bazic (EAB)

Servesc la aprecierea statusului acid-bază în sânge şi depind de locul de recoltare al sângelui (arterial / capilar / venos = A/C/V):

- pH-ul actual este valoarea pH-ului sângelui recoltat în condiţii de anaerobioză; depinde de temperatura la care se lucrează; pH $_{37°C}$ = 7,45/ 7,40 / 7,35 (A/C/V);
- presiunea parţială a CO_2 (pCO_2) serveşte la determinarea componentei acide a tamponului; pCO_2 = 35/40/45 mmHg (A/C/V);
- bicarbonatul actual (BA) este concentraţia bicarbonatului la 37°C, în sângele recoltat anaerob; normal: 24 ± 2 / 25± 2 mmol/L (A / V);
- bicarbonatul standard (BS) este concentraţia în bicarbonat a plasmei echilibrate la 37°C, cu pCO_2 = 40 mmHg (valoarea din alveolele pulmonare) şi o saturaţie în O_2 = 100%; la pH = 7,4, BS = 24 mmol/L;

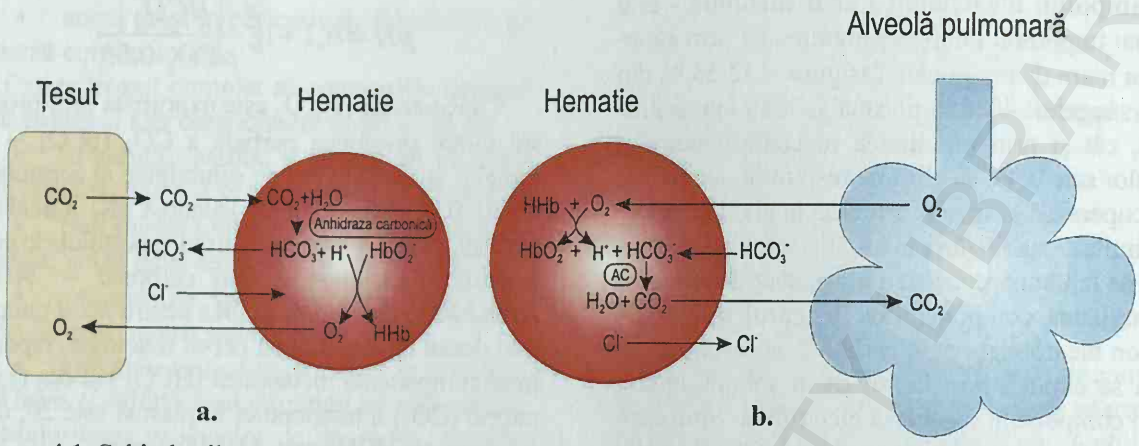


Figura 4.1. Schimburile gazoase între țesuturi și hematii (**a**), respectiv între hematii și alveole pulmonare (**b**)

- CO_2 total, TCO_2 (rezerva alcalină), reprezintă conținutul în CO_2 al BA și H_2CO_3 din plasma separată anaerob la 37°C; normal: 25±2/ 26±2 mmol/L (A/V) sau 55 vol. % CO_2.
- bazele tampon (BT = BB = buffer base) reprezintă suma anionilor tampon (BA+Hb+Prot); normal: 48±2 mmol/L
- bazele tampon standard reprezintă suma anionilor tampon, în situația ideală (BA = BS, Hb = 14g/dL, Prot = 70g/L):

  BB_{st}= BS+Hb+Prot = 48 mmol/L
- baze exces (BE) reprezintă abaterea pozitivă (exces de baze, +BE) sau negativă (deficit de baze, -BE) a BB_{actual} de la $BB_{standard}$; normal: ±2 mmol/L
- presiunea parțială a oxigenului: pO_2 = 75/ 90/ 105 mmHg (V / C / A).
- saturația în oxigen a hemoglobinei: 94-100%/ 60-85% (A / V)
- lacuna anionică, LA (*anion gap*), reprezintă suma anionilor plasmatici, alții decât Cl^- și HCO_3^- (lactat, corpi cetonici, sulfați, fosfați); se calculează din ecuația:

LA = $[Na^+]+[K^+]-[Cl^-]-[HCO_3^-]$; în sângele venos = 5 - 14 mmol/L.

4.1.2.3 Mecanisme biologice (fiziologice) de reglare a echilibrului acido-bazic

Capacitatea de tamponare a sângelui poate neutraliza produșii de degradare cu caracter acid numai pentru o scurtă perioadă. De exemplu, cantitatea de acid lactic produsă prin arderea a 12 g glucoză, consumă întreaga capacitate de tamponare a volumului sângelui circulant. Din acest motiv, capacitatea de tamponare a sângelui se epuizează rapid și asigură numai neutralizarea imediată și temporară a metaboliților acizi. Valoarea practic constantă a capacității de tamponare a sângelui se menține totuși prin regenerarea continuă a acesteia. Această regenerare se realizează prin două mecanisme: mecanismul respirator elimină excesul bioxidului de carbon prin expirația pulmonară, iar mecanismul metabolic (renal) recuperează cantitatea consumată a bicarbonaților (rezervei alcaline). Tamponul bicarbonat este unic: rămânând în echilibru cu aerul atmosferic, se crează un sistem deschis cu o capacitate de tamponare mult mai mare decât a oricărui sistem închis.

Hematiile, plămânii și rinichii dețin rolurile centrale în regenerarea sistemelor tampon ale organismului.

a. Rolul hematiilor și al plămânilor - transportul și eliminarea CO_2

Marea capacitate a plămânilor de compensare a aciditătii actuale și titrabile reiese din faptul că în urma unei alimentații fiziologice (2.000 kcal/zi), se formează zilnic în organism cca. 500 g bioxid de carbon și 42 g H^+. Bioxidul de carbon, ca produs final al arderii carbonului, fiind un gaz molecular neelectrolitic prezent în exces în lichidul interstițial și sânge, trece ușor prin membrane, inclusiv cea a hematiilor. În interiorul acestora și în prezența apei (sub acțiunea anhidrazei carbonice – AC – enzimă zinc-dependentă) bioxidul de carbon se transformă în acid carbonic. Din disocierea electrolitică a acestuia din urmă, se pun în libertate ioni de HCO_3^- și H^+. Protonii se fixează temporar de molecula hemoglobinei reduse, care se comportă ca un acid slab (pKa=7,3), prin cedarea în schimb a ionilor de K^+ pentru neutralizarea bicarbonaților, care trec din hematii în plasmă, pe seama unui schimb reciproc cu clorurile (*Figura 4.1a*). Cu învelișul lor bogat hidratat, acestea introduc în hematii cantități însemnate de apă, ducând la creșterea volumului eritrocitar și a valorii

hematocritului în sângele venos (fenomenul de membrană al lui Hamburger).

Din interstiţiul alveolar pulmonar oxigenul molecular (O_2) trece în plasmă, apoi în hematii. Hemoglobina redusă se oxigenează, devine mai acidă (pK_a=7,16) şi capabilă să elibereze prin disociere protonii fixaţi, în schimbul refixării ionilor de K^+ cedaţi în sângele venos (*Figura 4.1b*). Protonii eliberaţi formează cu bicarbonaţii acid carbonic, care sub acţiunea carboanhidrazei se descompune în bioxid de carbon şi apă. Bicarbonaţii descompuşi intraeritrocitar se înlocuiesc cu bicarbonaţii din plasmă, paralel cu ieşirea cantităţilor echivalente de cloruri. Astfel, în sângele arterial, pe de o parte bicarbonaţii plasmatici în exces se descompun (în hematii) în bioxid de carbon şi apă, iar pe de altă parte, din cauza ieşirii clorurilor puternic hidratate din hematii, volumul acestora se va micşora, paralel cu scăderea valorii hematocritului din sângele arterial. În sfârşit, gradul eliminării sau retenţiei bioxidului de carbon este condiţionat de intensitatea respiraţiei: hipoventilaţia duce la creşterea presiunii parţiale tisulare-sanguine a bioxidului de carbon (pCO_2), adică la manifestarea unei acidoze respiratorii (prin hipercapnie), iar în urma unei respiraţii forţate se manifestă o alcaloză respiratorie (prin hipocapnie).

Elementele cheie care determină schimburile şi transporturile gazoase la nivelul plămânilor şi ţesuturilor sunt:

- În ţesuturi se formează CO_2 şi acizi, deci pH-ul este scăzut; în acest mediu oxihemoglobina cedează oxigen şi se protonează.
- În plămâni are loc oxigenarea hemoglobinei şi cedarea protonilor.
- Permeabilitatea selectivă a membranelor celulare şi a membranei hematiilor pentru H_2O, CO_2, HCO_3^- şi Cl^-. Valoarea constantei de difuziune a bioxidului de carbon este de 200 mL/min/barr, iar a moleculelor de oxigen este de 10 ori mai mică.
- Anhidraza carbonică (AC) accelerează de 100 de ori viteza de formare a H_2CO_3. AC se găseşte în hematii, celule parietale ale mucoasei gastrice, celulele tubilor uriniferi.
- Hemoglobina: oxihemoglobina (HbO_2) are pKa mai mic decât HbH (cedează mai uşor H^+).
- Transportul bioxidului de carbon prin sânge se face în trei moduri diferite: dizolvat în plasmă (2-3 ml / 100 ml), sub formă de bicarbonat (HCO_3^-), combinat cu proteine, legat covalent la capătul lor amino terminal (proteine + CO_2 → proteine-NH-COOH).
- Ventilaţia: centrul respirator din trunchiul cerebral este sensibil la scăderea pH-ului, a pO_2 şi la creşterea pCO_2.
- Surfactantul pulmonar este substanţa fosfolipidică cu efect tensioactiv care împiedică colabarea pereţilor alveolari.
- Gradientul de presiune parţială al bioxidului de carbon (pCO_2): 40 mmHg în sângele arterial şi 46 mmHg în cel venos (în atmosferă pCO_2 = 0,3 mmHg).

b. Rolul rinichilor

Rinichii elimină acizii nevolatili rezultaţi din catabolismul aminoacizilor sulfuraţi (HSO_4^-), fosfolipidelor ($H_2PO_4^-$), acizilor graşi (corpi cetonici).

La nivel renal are loc reabsorbţia/ recuperarea bicarbonaţilor filtraţi (în tubul proximal), secreţia protonilor (în tubii distali)/ neoformarea bicarbonatului (*Figura 4.2*).

Dacă pH-ul urinar este sub 6, concentraţia HCO_3^- urinar este foarte scăzută (< 0,1 mmol/L). Ultrafiltratul glomerular are 24 mmol HCO_3^-/L (4500 mmol/zi), cea mai mare parte fiind reabsorbită (90% în tubul contort proximal). Protonii secretaţi de celulele tubulare (majoritatea la schimb cu Na^+ şi doar o mică parte de o H^+ATP-ază) interacţionează cu HCO_3^- filtrat, formând H_2CO_3. În prezenţa anhidrazei carbonice (tip IV) H_2CO_3 din lumen se transformă rapid în CO_2 + H_2O. CO_2 penetrează liber membrana celulei tubulare renale spre interior, refăcând H_2CO_3 sub acţiunea anhidrazei carbonice (tip II). Prin disocierea H_2CO_3 se formează H^+ şi HCO_3^-, protonii se reîntorc în lumenul tubular (la schimb cu sodiul), iar bicarbonatul părăseşte celula prin membrana bazolaterală, în cotransport cu Na (rezultatul net fiind transferul $NaHCO_3$ din lumenul tubular în sângele capilarelor peritubulare). Inhibitorii de anhidrază carbonică (acetazolamida), interferă cu reabsorbţia proximală a $NaHCO_3$, inducând o diureză osmotică a acestuia.

Producerea HCO_3^- *de novo* se face pe seama formării/eliminării ionului amoniu şi a acidităţii titrabile.

Excreţia NH_4^+

La nivelul tubului contort distal se eliberează amoniacul din glutamină sub acţiunea glutaminazei şi eliminarea amoniacului (NH_3) cuplat cu protoni în urină, sub formă de ioni de amoniu.

Producerea renală a amoniacului are loc în celulele tubulare proximale, din glutamina care intră în celule din filtratul glomerular, dar şi din sângele capilarelor peritubulare. În interiorul celulei gluta-

mina intră în mitocondrie, unde este dezaminată în două etape (sub acțiunea dezaminazei I și glutamico-dezaminazei), rezultând doi ioni amoniu (NH_4^+) și un anion alfa-cetoglutarat. NH_4^+ este secretat în lumenul tubular (cu concursul schimbului Na^+-H^+), iar anionul alfa-cetoglutarat este oxidat la 2 HCO_3^- + 4 CO_2 + H_2O. Bicarbonatul iese din celulă la nivelul membranei bazolaterale, prin cotransport cu Na^+ (pentru fiecare ion NH_4^+ excretat, un ion HCO_3^- intră în lichidul extracelular).

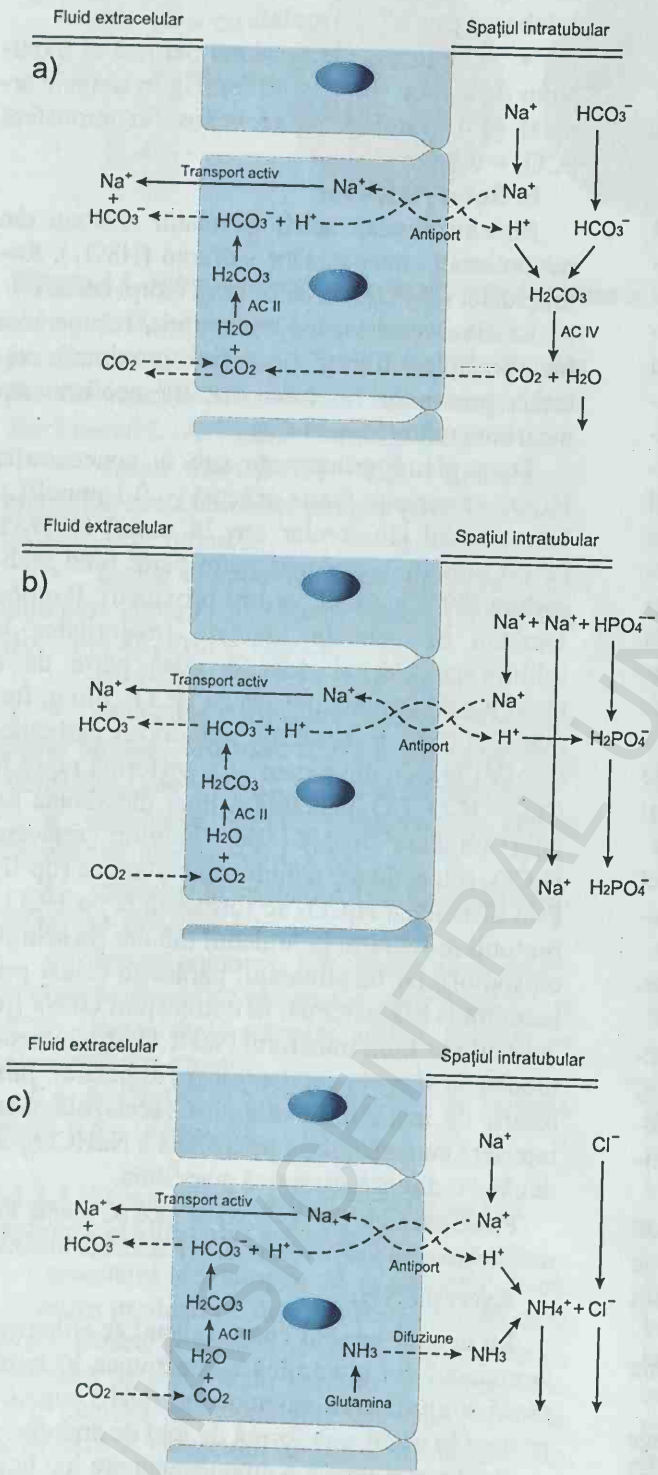


Figura 4.2. a) Recuperarea bicarbonatului la nivelul tubului contort proximal, b), c) Neoformarea de bicarbonat în tubul contort distal

În jur de 40 mmol de protoni se elimină zilnic în felul acesta. Această cantitate poate crește chiar de 10 ori în acidozele din diabetul zaharat. Acest mecanism funcționează la nivelul tubilor renali distali prin reacții metabolice cuplate cu schimburile ionice active între H^+ intracelular și Na^+ intratubular, respectiv prin difuziunea neionică a NH_3 din interiorul celulelor tubulare în lichidul tubular și transformarea lui prin fixarea unui proton în ion de amoniu (NH_4^+). Pe seama fiecărui proton fixat poate fi reabsorbit și urmat de bicarbonat, încă un ion de Na^+. Membrana celulelor tubulare este impermeabilă pentru ionii de amoniu (în contrast cu moleculele neionizate ale amoniacului), din cauza caracterului lor de electrolit slab. Astfel, fiecare moleculă de amoniac excretat fixează câte un proton, prin care reduce aciditatea urinei, neutralizând acizii organici (uric și oxalic). Ionii de H^+ folosiți pentru schimburile H^+/Na^+ provin și în acest caz din disocierea electrolitică a acidului carbonic, format (sub acțiunea carboanhidrazei) din bioxid de carbon și apă. Ionii de H^+ se excretă în lichidul tubular, fiind schimbați cu câte un ion de Na^+.

În acidoze acute, eliminarea renală a NH_4^+ poate crește pe seama NH_3 din sângele venos renal. Un pH acid intracelular activează transportul mitocondrial al glutaminei și dezaminarea /oxidarea acesteia.

În acidoze cronice are loc activarea transportorilor bazolaterali și mitocondriali ai glutaminei, dar și a glutaminazei și a altor enzime care participă la oxidarea glutaminei. Această adaptare la acidoza cronică, permite excreția urinară a unei mari cantități de NH_4^+, la orice pH, chiar neutru.

Eliminarea aciditații titrabile

Principalul tampon urinar este tamponul fosfat. La pH 7,4 (în filtratul glomerular), doar 20% din totalul fosfaților sunt în formă diacidă ($H_2PO_4^-$), restul fiind monoacizi (HPO_4^{2-}). Protonii excretați în lichidul tubular renal proximal, pe de o parte transformă fosfații primari (Na_2HPO_4) în fosfați secundari (NaH_2PO_4) și duc la creșterea progresivă a aciditații urinii (la pH 6,8 cele două specii ionice se găsesc în proporție egală). Pe de altă

parte ionii de Na^+ reabsorbiți, împreună cu ionii de bicarbonat reținuți în celulele tubulare, sunt eliminați spre sângele vaselor recta peritubulare, ridicând astfel capacitatea lui de tamponare. Prin transformarea Na_2HPO_4 în NaH_2PO_4 aproximativ 30 mmol protoni se elimină zilnic.

Secreția protonilor în tubii colectori, sub acțiunea ATP-azei pentru protoni, poate acidifia urina la pH < 6; la pH < 4,6 practic toți ionii fosfat se găsesc în formă $H_2PO_4^-$.

Excreția HCO_3^- se produce doar dacă concentrația bicarbonatului plasmatic depășește 28 mmol/L. Capacitatea regeneratoare a rinichilor poate fi apreciată având în vedere faptul că, în urma consumării unui regim alimentar obișnuit, rinichii excretă prin urină, în 24 de ore, o cantitate de 20-30 mmol H^+ (acizi titrabili). Ca urmare urina definitivă are o reacție acidă, cu valorile acidității actuale între pH = 4,5-6,9. Este de remarcat că, din cauza substanțelor tampon prezente în urină, valoarea maximă a acidității urinare nu poate să coboare sub pH=4,5 nici în cazul unei acidoze deosebit de grave. Aciditatea titrabilă a urinii (cantitatea absolută a acizilor excretați prin urină) poate crește totuși chiar și peste 150 mmol/zi.

Alte sisteme tampon, cum ar fi creatinina și β -hidroxibutiratul contribuie la eliminarea acidității titrabile doar la pH < 5.

Rata eliminării renale a acidității titrabile depinde de pH-ul urinei și de rata de eliminare a sistemelor tampon. În acidoză, eliminarea de aciditate titrabilă crește semnificativ pe seama β -hidroxibutiratului (de la 30 la 300 mmol/zi).

c. Alte mecanisme de reglare a echilibrului acido-bazic

Stomacul intervine în reglarea echilibrului acido-bazic prin producere de acid clorhidric (H^+Cl^-) și eliberarea acestuia în sucul gastric, respectiv importul de HCO_3^- în sânge. Prin vomă se pierd protoni, ceea ce duce la alcaloză.

Sucul duodenal este bogat în HCO_3^- (rezultând acidifierea sângelui în faza intestinală a digestiei).

Ficatul transformă lactatul în glucoză, iar aceasta în glicogen. La nivel hepatic au loc procese importante în detoxificare, cum ar fi sulfoconjugarea și glucuronoconjugarea (acizii respectivi fiind eliminați în formă legată).

La nivelul pielii, pH-ul secreției sudorale este dependent de pH-ul sanguin (de obicei este ușor acid).

4.2 Variații fiziologice și patologice ale parametrilor echilibrului acido-bazic

4.2.1 Fiziologice

- legate de vârstă: persoanele în vârstă au pH-ul organismului în general mai acid decât tinerii;
- perioadele zilei: dimineața, „à jeun", pH-ul este mai acid, datorită respirației superficiale din timpul nopții;
- fazele digestiei: digestia gastrică crește pH-ul sanguin prin reținerea H^+ la nivelul stomacului, iar digestia intestinală scade pH-ul sanguin prin mecanism invers;
- starea de efort: efortul muscular intens produce o scădere trecătoare a pH-ului sanguin prin acidul lactic eliberat în glicoliza anaerobă.

4.2.2 Patologice

Orice modificare funcțională endogenă sau acțiune exogenă care duce la scăderea sau creșterea acidității titrabile a sângelui și a lichidelor biologice, duce la apariția unor tulburări (mai mult sau mai puțin grave) ale funcțiilor celulare. Conform celor două mecanisme - pulmonare și metabolice - ale reglării echilibrului acido-bazic, se pot deosebi patru tipuri ale acestor dereglări: acidoza respiratorie sau metabolică, alcaloza respiratorie sau metabolică. În fazele incipiente, fiecare formă a dereglărilor echilibrului acido-bazic este compensată din punct de vedere funcțional, adică nu duce la modificarea însemnată a acidității actuale (a valorii pH), nici la apariția tulburărilor funcționale. În cazul unor dereglări mai grave, tulburarea devine manifestă, solicitând intervenția terapeutică imediată.

Acidozele și alcalozele sunt definite ca scăderi, respectiv creșteri ale pH-ului, având diverse cauze (respiratorii sau metabolice/ nonrespiratorii). Orice tulburare a EAB decurge în 4 faze:

1. generarea (cauze),
2. tamponarea (corectarea imediată fizico-chimică),
3. compensarea,
4. regenerarea sistemelor tampon.

a.**Acidoza metabolică** poate apărea în diverse situații patologice însoțite de:

- acumulări de acizi (insuficiențe renale, cetoacidoza diabetică, acidoza lactică, metabolism anaerob),
- pierderi de baze (diaree, acidoză tubulară renală).

Tabelul 4.II. Tulburări ale echilibrului acido-bazic şi compensarea lor imediată

Tulburări ale EAB	pH	pCO_2	HCO_3^-	BE	Observaţii
1.Acidoză metabolică					*Stare cu pH şi HCO_3^- scăzute
• necompensată	↓	N	↓	↓	şi cu valori negative ale BE;
• compensată	N	↓	↓	↓	pCO2 scade până la pH normal;
2.Alcaloză metabolică					*Stare cu pH şi HCO_3^- crescute
• necompensată	↑	N	↑	↑	şi cu valori pozitive ale BE;
• compensată	N	↑#	↑	↑	pCO2 creşte până la pH normal;
3.Acidoză respiratorie					*Stare cu creştere primară a pCO_2
• necompensată	↓	↑	N	N	fără modificări ale BE şi HCO_3^-;
• compensată	N	↑	↑	↑	HCO_3^- creşte până la pH normal;
4.Alcaloză respiratorie					*Stare cu scădere primară a pCO_2
• necompensată	↑	↓	N	N	fără modificări ale BE şi HCO_3^-;
• compensată	N	↓	↓	↓	HCO_3^- scade până la pH normal.

#(limitat, datorită hipoxiei centrului respirator)

b. **Alcaloza metabolică**, situaţie mai rar întâlnită, se poate datora:

- pierderilor de acizi (vomă, pierderi de suc gastric) sau
- administrării de baze în exces.

c. **Acidoza respiratorie** poate fi determinată de:

- depresia centrilor respiratori (supradozări de barbiturice, anestezice);
- obstrucţii ale căilor respiratorii (astm bronşic, bronşite, tumori);
- afecţiuni deformante ale peretelui toracic, care împiedică ventilaţia (cifo- scolioza, deformări ale cutiei toracice);
- boli circulatorii (insuficienţa cardiacă congestivă, şocul).

d. **Alcaloza respiratorie** poate apărea în urma:

- hiperventilaţiei (crize isterice, respiraţie artificială excesivă);
- lipsei de oxigen;
- stimularea toxică a centrilor respiratori (salicilaţi, hemoragie cerebrală, febră rebelă).

Clasificarea tulburărilor EAB în funcţie de originea / cauzele lor, precum şi mecanismele compensatorii / corectoare, sunt redate în *Tabelul 4.II.*

4.2.2.1 Acidozele

În cazul unei acidoze metabolice, creşterea conţinutului în sânge a unor acizi organici consumă capacitatea de tamponare (bicarbonaţii), cu formarea sărurilor lor şi a acidului carbonic. Ca urmare, scăderea cantităţii bicarbonaţilor plasmatici semnalizează fidel gravitatea acidozei. Mecanismele compensatorii imediate (*Tabel 4.II*) implică, pe lângă consumarea bicarbonaţilor, redistribuirea H^+ în spaţiul intracelular, paralel cu creşterea concentraţiei potasiului seric. Creşterea concentraţiei potasiului este între 0,1-0,9 mmol/L (în jur de 0,5 mmol/L) pentru scăderea de pH de 0,1 unităţi.

Compensarea respiratorie este maximă la 12-24 ore, probabil datorită traversării lente de către protoni a barierei hemato-encefalice spre chemoreceptorii centrului respirator, ceea ce duce la apariţia respiraţiei Kussmaul. Pentru scăderea cu 1 mmol/L a concentraţiei bicarbonatului, presiunea parţială a bioxidului de carbon va scădea cu 1,3 mmHg. Presiunea parţială a CO_2 corespunde aproximativ cu ultimele două cifre ale pH-ului.

Tratament: în cetoacidoză, de obicei situaţia se remite cu fluide injectabile şi insulină, necesitând administrarea de bicarbonat doar în acidoză profundă.

Acidoza din insuficienţa renală cronică şi acidoza tubulară distală se tratează cu cantităţi mici de bicarbonat, până la 30-60 mEq/zi. În acidoza tubulară proximală se produc pierderi masive de HCO_3^-, nu ajută administrarea de bicarbonat, dar restricţia de săruri scade pierderile de HCO_3^-.

Acidoza lactică răspunde favorabil la administrare de bicarbonat şi CO_2, acesta din urmă penetrează bariera hematoencefalică, stimulând centrul respirator.

În cazul unei acidoze respiratorii, creşterea acidităţii sângelui apare în urma unei retenţii de bioxid de carbon, cauzate de tulburarea respiraţiei. În urma creşterii cantităţii bioxidului de carbon creşte compensator şi cantitatea bicarbonaţilor în sânge, care în ciuda acidozei existente, poate depăşi limita superioară a valorilor normale.

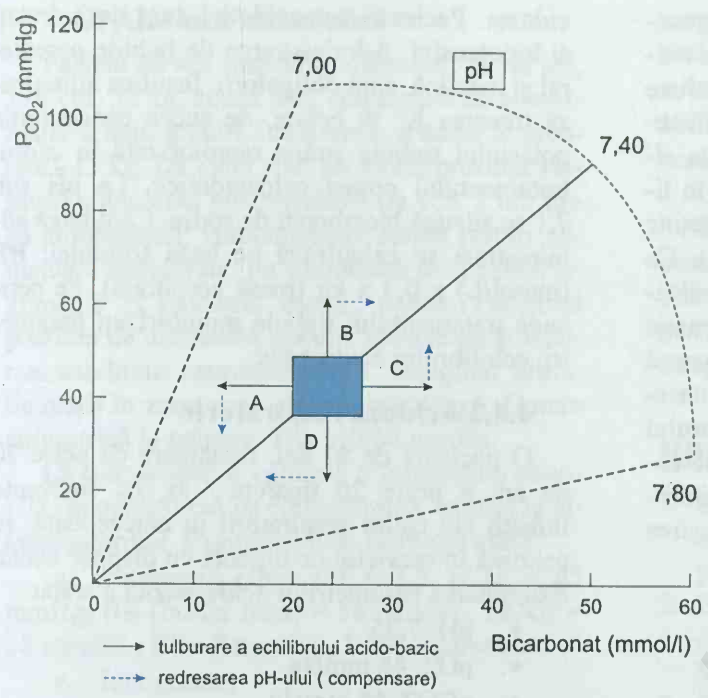


Figura 4.3. Modificarea rezervei alcaline în cursul tulburărilor acute ale echilibrului acido-bazic: A – acidoză metabolică, B - Acidoză respiratorie, C – Alcaloză metabolică, D – Alcaloză respiratorie

4.2.2.2 Alcalozele

Datorită caracterului mai mult acid al produşilor de catabolism, probabilitatea manifestării în organism a unei alcaloze metabolice sau respiratorii este mult mai mică. Acestea pot apare în urma unor pierderi excesive de acid gastric (vărsături îndelungate) sau prin utilizarea exagerată a bicarbonaţilor pentru scopuri terapeutice, cu creşterea marcată a rezervei alcaline în plasmă. O alcaloză respiratorie se poate manifesta din cauza unei hiperventilaţii spontane (în hipoxie) sau mecanice. În cazul acesta, în ciuda alcalozei evidente, din cauza hipocapniei, valoarea rezervei alcaline plasmatice poate fi uneori mult sub limita inferioară a valorii fiziologice.

Alcaloza metabolică se asociază cu scăderea potasemiei şi calcemiei. Curba de disociere a oxihemoglobinei se deplasează la stânga (creşte afinitatea hemoglobinei pentru oxigen). După 6-8 ore creşte concentraţia 2,3-difosfogliceratului, ceea ce aduce curba de disociere înapoi. Creşterea concentraţiei bicarbonatului peste 50 mmol/L duce la afectări neurologice (letargie, confuzie, stupoare, agitaţie, comă).

Compensarea respiratorie se face prin hipoventilaţie, la presiunea parţială a CO_2 nu mai mare decât 55 mmHg, deoarece hipoxemia stimulează chemoreceptorii periferici. Pentru o creştere a concentraţiei bicarbonatului cu 1 mmol/L, pCO_2 creşte cu 1,3 mmHg.

Tratament: creşterea volumului plasmatic cu soluţii izotonice pentru a permite rinichiului să excrete bicarbonat (se elimină cu potasiu, de aceea se recomandă suplimentarea de K^+). Rareori intervenţia de urgenţă necesită administare de săruri acidifiante (NH_4Cl, Arginin monohidroclorid).

Modificările rezervei alcaline în cursul diferitelor forme compensate şi manifeste ale tulburărilor echilibrului acido-bazic, sunt prezentate grafic în *Figura 4.3.*

Legătura strânsă a metabolismului hidro-mineral şi a echilibrului acido-bazic se realizează prin intermediul funcţiilor renale. Dinamismul acestei legături poate fi demonstrat prin prezentarea fenomenelor manifestate în cursul dezvoltării unei alcaloze metabolice. În urma unor vărsături îndelungate se pierd cantităţi însemnate de acid clorhidric. Concomitent se instalează o hipocloremie, cu creşterea în sânge a cantităţii bicarbonaţilor, care înlocuiesc clorurile şi duc la manifestarea unei alcaloze metabolice. La nivelul tubilor renali proximali, reabsorbţia clorurilor şi a bicarbonaţilor este invers proporţională. Cu cât reabsorbţia tubulară a clorurilor este mai mică, cu atât se reabsorb în sânge mai mulţi bicarbonaţi.

Restabilirea valorii cloremiei şi încărcarea volemică, determină eliminarea renală a excesului de bicarbonaţi şi alcaloza metabolică hipocloremică dispare. Ca urmare, este evident că în urma instalării unei hipocloremii se manifestă şi o alcaloză metabolică, care va fi cu atât mai gravă, cu cât valoarea cloremiei este mai mică.

4.3 Potasemia şi echilibrul acido-bazic

Modificările potasemiei influenţează în mod deosebit echilibrul acido-bazic. În cursul tuturor stărilor cu pierdere de potasiu, conţinutul scăzut în K^+ al lichidului extracelular şi al plasmei se înlocuieşte din celule. În cursul acestei înlocuiri, în schimbul a 3 ioni de K^+ ieşiţi din celule, pătrund 2 Na^+ şi un H^+. Ca urmare, pe de o parte scade conţinutul în K^+ al celulelor, pe de altă

parte creşte conţinutul lor în H^+ (acidoza intracelulară), pe seama scăderii extracelulare a cantităţii H^+, ducând la manifestarea unei alcaloze metabolice. Această situaţie se stabileşte şi în celulele epiteliului tubular renal, care, în ciuda alcalozei metabolice manifestate în sânge şi în lichidul extracelular, excretă ioni de H^+ şi reţine bicarbonaţii în sânge (acidurie paradoxală). Ca urmare, în această formă hipopotasemică a alcalozei metabolice, se excretă o urină cu reacţie acidă. Această stare se menţine şi se agravează continuu, până la readucerea la normal a potasemiei. În urma descoperirii şi înlăturării factorului cauzal, urmată de restabilirea potasemiei, se corectează spontan şi rapid echilibrul, prin reintrarea ionilor de K^+ în celule, respectiv prin ieşirea din celule a excesului de H^+.

4.4 Prezentări de caz

4.4.1 Coma acido-cetozică

O tânără de 20 ani cu masă corporală de 50 kg, este diagnosticată cu diabet zaharat de tip I în urmă cu 4 luni. Ca urmare a unei infecţii urinare, pacienta renunţă la tratamentul cu insulină; trece şi printr-o perioadă de stres intens (sesiunea de examene). Este găsită în stare comatoasă de familie.

La examenul obiectiv pacienta este inconştientă, cu tegumente uscate, este tahipneică şi cu halenă acetonică, presiunea arterială = 80/50 mmHg.

Examinările de laborator arată:

- Glicemie: 580 mg/dL
- Parametrii EAB: pH = 7,0; pCO_2 = 30 mmHg; BB (buffer base) = 36 mmol/L, HCO_3^- = 15 mmol/L, BE= -12 mmol/L, LA= 27 mmol/L
- Ionogramă:
  - Na^+: 147 mmol/L
  - K^+: 5,0 mmol/L
  - Cl^-: 110 mmol/L

Comentariu:

Acidoza metabolică decompensată este diagnosticată pe baza valorilor pH-ului şi BE. LA confirmă tulburarea echilibrului acido-bazic: se datorează creşterii acizilor nevolatili (corpi cetonici în cazul nostru). Infecţiile şi stresul (datorită eliberării excedentare de hormoni cu efect hiperglicemiant) cresc necesarul de insulină la diabetici. Scăderea dozelor de insulină, sau chiar oprirea tratamentului, favorizează apariţia cetoacidozei. Pacienţii cetoacidotici sunt deshidrataţi şi hipotensivi. Administrarea de lichide parenteral şi insulină, sunt obligatorii. Insulina stimulează trecerea K^+ în celule, de aceea concentraţia potasiului trebuie strâns monitorizată în cadrul tratamentului comei cetoacidotice. La pH sub 7,1 se adaugă bicarbonat de sodiu. Cantitatea administrată se calculează pe baza formulei: BE (mmol/L) x 0,3 x kg (masă corporală). Pe perioada tratamentului trebuie monitorizaţi parametrii echilibrului acido-bazic.

4.4.2 Acidoză respiratorie

O pacientă de 57 ani, fumătoare de peste 30 de ani a peste 20 ţigarete / zi, cu frecvente infecţii ale căilor respiratorii în antecedente, se prezintă în serviciul de urgenţă cu dispnee acută. Examinarea parametrilor acido-bazici a arătat:

- pH: 7,35
- pO2: 46 mmHg
- pCO2: 55 mmHg
- bicarbonat: 36 mmol/L

Comentariu:

Pacienta prezintă o acutizare a patologiei pulmonare obstructive cronice, însoţită de acidoză respiratorie compensată metabolic. Hipoxia este un factor important în menţinerea ventilaţiei, de aceea administrarea oxigenului la această pacientă trebuie făcută cu precauţie, sub monitorizare atentă a presiunii parţiale a gazelor sanguine.

4.4.3 Alcaloză respiratorie cauzată de hiperventilaţie

Un tânăr de 25 ani se prezintă în serviciul de urgenţă în criză de astm bronşic. Parametrii EAB determinaţi la sosire au arătat următoarele valori: pO2 – 70 mmHg, pCO2 – 30 mmHg, pH – 7,5. Pacientul a fost tratat cu salbutamol aerosol (stimulant adrenergic β2), sub efectul bronhodilatator al acestuia starea lui ameliorându-se.

Comentariu:

Gazele sanguine ale acestui pacient arată o uşoară alcaloză respiratorie, datorată probabil hiperventilaţiei (în cursul căreia CO_2 se elimină, fără o oxigenare eficientă însă). Alcaloza determină o creştere a gradului de legare a ionilor de calciu la proteinele plasmatice, ceea ce va creşte excitabilitatea neuro-musculară la pacientul în cauză.

Acidoza respiratorie datorită incapacităţii de eliminare a CO_2, apare doar în formele foarte severe de criză astmatică.

4.4.4 Alcaloză metabolică

Pacient de sex masculin, muncitor, 59 de ani, 178 cm, 52 kg, acuză jenă epigastrică de aproximativ 6 luni, greţuri, inapetenţă, scădere în greutate - 15 kg. De cinci zile, pacientul prezintă vărsături abundente postprandiale (la cca. 2 ore după alimentaţie); vomismentele conţin resturi alimentare nedigerate. La examinare se constată tegumente şi mucoase uscate, palide. Pacientul prezintă de asemenea spasme musculare şi hiperexcitabilitate neuromusculară. Ganglion limfatic mărit în zona supraclaviculară stângă. Durere epigastrică la palpare, TA: 110/60 mmHg.

La endoscopie se constată o formaţiune tumorală conopidiformă pe curbura mică, extinsă la nivelul pilorului. Examinările de laborator arată:

- Parametrii EAB: pH = 7,5; pCO_2 = 45 mmHg; BB (buffer base) = 56 mmol/L, HCO_3^- = 35 mmol/L, BE= 8 mmol/L, LA= 4 mmol/L
- Ionograma:
  - Na^+: 145 mmol/L
  - K^+: 3,0 mmol/L
  - Cl^-: 115 mmol/L
  - Ca total: 2,5 mmol/L
  - Ca^{2+}: 0,9 mmol/L

Comentariu:

Voma prelungită, datorită obstrucţiei de pilor ca urmare a unei tumori gastrice, poate conduce la alcaloză metabolică. Consecinţa deficitului de protoni este modificarea raportului între componenta liberă şi cea legată de proteinele plasmatice a calciului seric; simptomatologia secundară caracteristică hipocalcemiei, se datorează scăderii componentei libere. Scăderea potasiului se datorează orientării spre spaţiul intracelular la schimb cu protonii, iar creşterea clorurilor – eliminării preferenţiale a bicarbonatului la nivel renal.

4.4.5 Anemia ca şi cauză de dispnee

O persoană de sex masculin de 36 ani se prezintă la un consult medical în urma constatării că la urcarea scărilor dintre două etaje, are dispnee acută şi oboseală marcată. Radiografia toracică şi electrocardiograma nu au evidenţiat nimic semnificativ; gazele sanguine au fost în limite normale. Din anamneza atentă se deduce că pacientul a folosit timp îndelungat antiinflamatorii nesteroidice pentru dureri articulare cronice. Hemograma efectuată a arătat următoarele rezultate: hemoglobina – 10g/dL (normal 13-17 g/dL), volumul corpuscular mediu – 70 fL (normal 80-100 fL), iar feritina serică – 10 μg/L (valoarea normală – 30-300 μg/L).

Comentariu:

Simptomatologia şi rezultatele de laborator orientează diagnosticul spre o anemie cu deficit cronic de fier, datorat unui ulcer gastric cu pierderi sanguine (cauzat de utilizarea îndelungată a terapiei antiinflamatorii nesteroidice).

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.333-344.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleşca-Manea Luminiţa – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică,* 1998, p.294-322.
4. Devlin T. – *Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, p. 1025-1058.
5. Guyton A. C. – *Textbook of Medical Physiology,* Ed. 7, W.B.Saunders Company, 1986, p. 493-502.
6. Kaplan A.L., Pesce J.A. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984. p.387-402.
7. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996, p.98-115.
8. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry,* Ed.5, Mosby, 2004, p.41-61.
9. Mayne P.D. – *Clinical Chemistry in diagnosis and treatment,* Ed 6., Arnold, 1994, p.79-104.
10. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine,* Williams & Wilkins, 1994 p. 331-354.
11. Mihele Denisa – *Biochimie Clinică,* Ed. Medicală, 2001.
12. Pagana Kathleen, Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 69-71, 157-161.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 5.
Hemoproteine şi metabolismul fierului

Enikö Nemes- Nagy

Hemoproteinele reprezintă un grup de heteroproteine (metaloproteine cu fier, specializate în transportul, depozitarea şi utilizarea oxigenului) cuprinzând mioglobina şi hemoglobina, citocromii transportori de electroni şi diverse oxidaze. Gruparea prostetică a acestora este hemul.

5.1 Hemoglobina şi mioglobina

Hemoglobina şi mioglobina sunt proteine globulare colorate datorită dublelor legături conjugate din cadrul hemului, de aceea ele se mai numesc cromoproteine. Hemoglobina are formă oligomerică (este formată din 4 protomeri), transportă oxigenul de la plămâni, prin sânge, la ţesuturile periferice, iar mioglobina (este monomer) are rolul de a stoca oxigenul în interiorul celulelor musculare. Hemoglobina intervine şi în transportul bioxidului de carbon şi al protonilor de la ţesuturile periferice la plămâni.

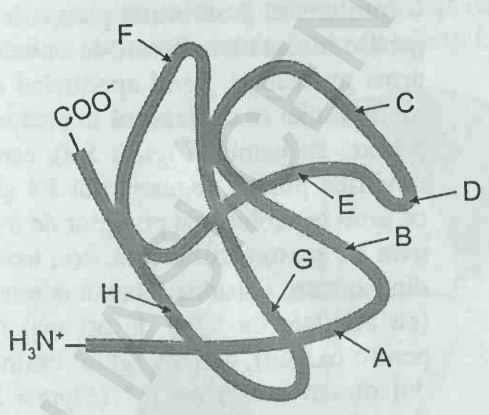


Figura 5.1. Structura terţiară a Mb şi monomerului de Hb

5.1.1 Elemente structurale

Mioglobina este alcătuită dintr-o singură catenă proteică formată din 153 resturi de aminoacizi. Hemoglobina adultului (HbA) este formată din 4 lanţuri de globină, 2α (lanţurile alfa conţin 141 aminoacizi) şi 2 lanţuri β (conţin 146 de aminoacizi), iar unele forme fiziologice de hemoglobină pot conţine alte lanţuri non a (γ,δ,ε). Fiecare lanţ globinic cuprinde 8 segmente, notate cu litere de la A la H (*Figura 5.1*). Hemoglobina (Hb) şi mioglobina (Mb) conţin aceeaşi grupare prostetică (hemul), alcătuită din protoporfirină IX şi Fe^{2+}. Protoporfirina conţine un nucleu tetrapirolic, inelele pirolice fiind legate între ele prin punţi metinice (*Figura 5.2*). Fiecare nucleu pirolic are 2 substituenţi (în ordine M, V, M, V, M, P, P, M). Fe^{2+} leagă reversibil oxigenul în raport molar 1:1, fără transfer de electroni şi nu se oxidează în Fe^{3+}, fiindcă astfel Hb şi-ar pierde capacitatea de a transporta oxigenul şi s-ar forma în urma reacţiilor anionul superoxid, foarte nociv:

$$Fe^{2+} - 1e^- \rightarrow Fe^{3+};$$

$$O_2 + 1\ e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$$

Pentru a împiedica aceste reacţii redox, hemul este învelit de catenele de globină, care formează o pungă de oxigenare hidrofobă în vecinătatea hemului, împiedicând pătrunderea apei, protejând starea inferioară de oxidaţie a fierului.

Ionul Fe^{2+} formează patru legături cu atomii de azot ai tetrapirolului, şi încă două legături coordinative cu atomii de azot ai tetrapirolului, şi încă două legături coordinative cu histidina proximală (His F8) şi respectiv cu cea distală

BCU MUCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

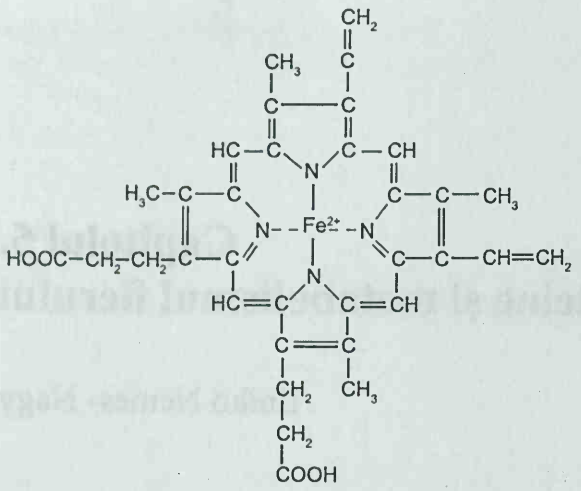


Figura 5.2. Structura hemului din Hb, Mb

(His E7). În interiorul moleculei apar radicali nepolari, hidrofobi (cu excepţia celor 2 histidine care coordinează fierul), iar spre exterior se poziţionează radicalii polari, hidrofili în contact cu mediul apos sanguin.

5.1.2 Oxigenarea hemoglobinei şi mioglobinei

Oxigenarea mioglobinei respectă legea acţiunii maselor (aceasta fiind un monomer): curba de oxigenare are aspect hiperbolic. Hemoglobina, fiind o proteină oligomerică la care protomerii acţionează prin cooperativitate pozitivă, realizând un efect alosteric homotrop (efectorul este chiar ligandul), are o curbă de oxigenare de aspect sigmoid (*Figura 5.3*). Ca urmare a diferenţei de presiune parţială a oxigenului la nivelul plămânilor (100 mmHg) şi a capilarelor musculare (20 mmHg), hemoglobina poate ceda 35-45% din oxigenul legat, aşadar este un transportor eficient de oxigen (presiunea parţială a O_2 la care Hb este saturată în proporţie de 50% este $p_{50}Hb = 26$ mmHg); în aceleaşi condiţii de presiune parţială a oxigenului mioglobina ar putea ceda doar 12% din oxigenul asociat, aşadar nu ar fi un transportor corespunzător; ea are rolul de a stoca temporar oxigenul în celule.

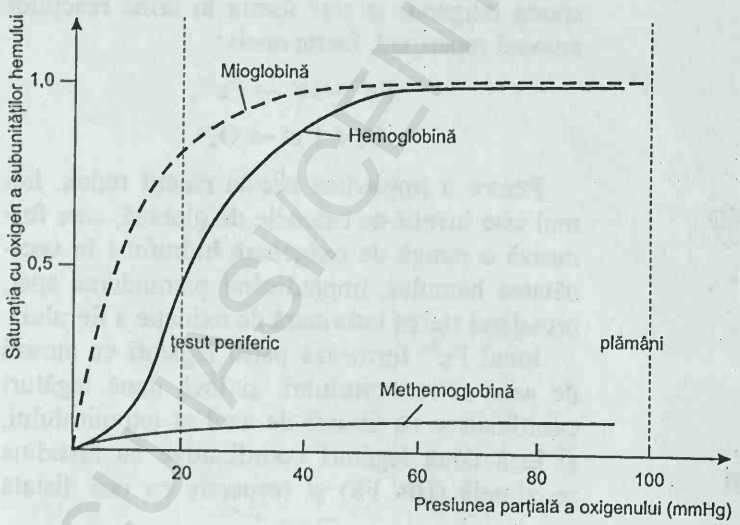


Figura 5.3. Curbele de oxigenare ale mioglobinei şi hemoglobinei

Oxigenarea mioglobinei se poate scrie sub forma reacţiei:

$$Mb + O_2 \leftrightarrow MbO_2.$$

Constanta de echilibru K a oxigenării este:

$$K = [MbO_2]/ ([Mb] \cdot [O_2]),$$

fracţia de oxigenare Y a mioglobinei este:

$$Y = [MbO_2]/([MbO_2]+[Mb]),$$

valoarea maximă a fracţiei de oxigenare fiind 1, atunci când toate moleculele de mioglobină sunt oxigenate. Substituind prima ecuaţie în a doua obţinem:

$$Y = (K \cdot [O_2])/(K \cdot [O_2] + 1).$$

Întrucât oxigenul molecular este în stare gazoasă, este convenabil să exprimăm concentraţia sa în termenii presiunii parţiale - pO_2 - astfel obţinem ecuaţia:

$$K \cdot pO_2/(K \cdot pO_2 + 1) = pO_2/(p_{50} + pO_2),$$

unde p_{50} este presiunea parţială a oxigenului la care jumătate din moleculele de mioglobină sunt oxigenate ($p_{50}Mb = 2,8$ mmHg).

În cazul moleculei de hemoglobină, prima dată se oxigenează unul dintre protomerii α (protomerii β au iniţial punga de oxigenare blocată cu un rest de valină). În urma procesului, fierul aparţinând acestui protomer se deplasează în poziţie coplanară cu hemul (*Figura 5.4*), ceea ce modifică poziţia segmentului F8 şi are ca urmare deblocarea pungilor de oxigenare ale protomerului beta, prin trecerea dintr-o stare tensionată într-una relaxată (cu afinitate de 5000 de ori mai mare pentru oxigen), astfel unghiul dintre cei doi dimeri creşte cu 15° (*Figura 5.5*). Primul protomer se oxigenează cel mai greu, al doilea şi al treilea protomer - mai uşor, iar ultimul – practic instantaneu (fenomen definit „cooperativitate pozitivă"). Tetramerul de hemoglobină

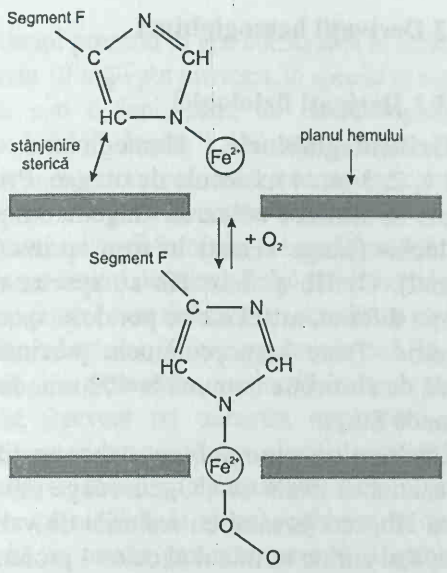


Figura 5.4. Modificarea poziţiei ionului Fe^{2+} faţă de planul nucleului tetrapirolic al hemului, în timpul oxigenării (segmentul F aparţine moleculei de globină, în imagine fiind redat doar radicalul histidinei proximale)

este saturat cu 4 molecule de oxigen. Oxigenarea este acompaniată de modificări conformaţionale importante şi de ruptura unor punţi saline existente între zonele carboxi- şi amino- terminale ale subunităţilor de Hb.

Oxigenarea hemoglobinei este influenţată de efecte alosterice heterotrope, la care efectorul care modifică centrul de reacţie este diferit de ligand (allos = altul, stereos = spaţiu), în urma unor modificări ale structurii terţiare/cuaternare a proteinei. Aceşti liganzi sunt protonii, CO_2 şi 2,3-difosfogliceratul (2,3-DPG). Mioglobina nu este o proteină alosterică, afinitatea ei faţă de O_2 este foarte puţin influenţată de aceşti efectori.

Efectul Bohr constă în influenţa pH-ului şi a presiunii parţiale a CO_2 (pCO_2) asupra oxigenării hemoglobinei. Scăderea pH-ului şi creşterea pCO_2 scad afinitatea hemoglobinei pentru oxigen, ceea ce ajută eliberarea oxigenului legat de hemoglobină la nivelul ţesuturilor periferice. Prin oxigenare la nivel pulmonar, hemoglobina devine un acid mai tare (pKa 7,16) comparativ cu hemoglobina care se întoarce din ţesuturile periferice (pKa 7,3); 1 O_2 deplasează 0,6 protoni de pe hemoglobină. Această reacţie poate fi descrisă prin ecuaţia următoare:

$$Hb4O_2 + 2H^+ \rightarrow Hb2H^+ + 4O_2$$

Datorită proceselor metabolice din ţesutul muscular, temperatura creşte şi mediul se acidifiază (datorită acumulării de acid lactic şi acid piruvic), astfel reacţia de mai sus are loc de la stânga la dreapta, iar în ţesutul pulmonar (pH şi pO_2 mai crescute decât în ţesuturi) reacţia este deplasată în sens invers.

Aproximativ 80 % din CO_2 rezultat în urma proceselor metabolice reacţionează cu apa, sub acţiunea catalitică a anhidrazei carbonice eritrocitare, formând acid carbonic care disociază în ioni bicarbonat şi protoni.

$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$$

Bicarbonatul intră în plasmă, alcătuind mai mult din 50% din rezerva alcalină a sângelui, iar protonii sunt captaţi de molecula de hemoglobină.

La nivelul capilarelor pulmonare, protonii eliberaţi în cursul oxigenării hemoglobinei, reacţionează cu ionii bicarbonat pentru a reface acidul carbonic care, la rândul său sub acţiunea aceleiaşi enzime, eliberează CO_2 care va fi eliminat apoi prin expiraţie.

$$H^+ + HCO_3^- \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O.$$

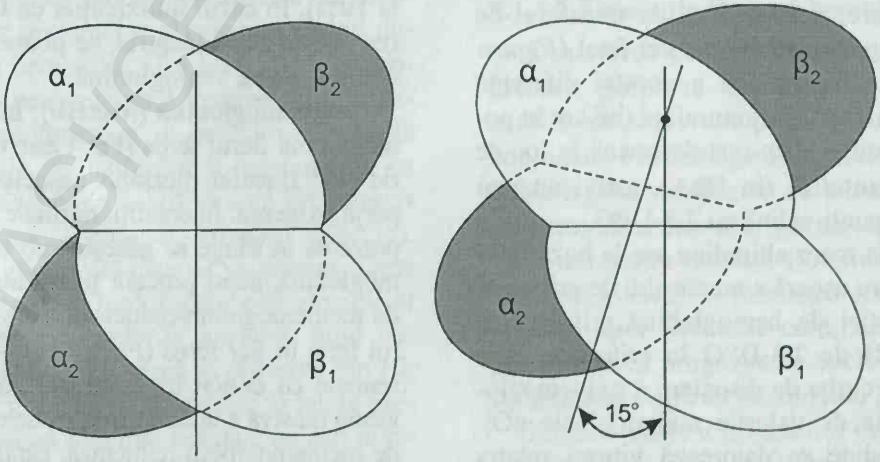


Figura 5.5. Reprezentare schematică a modificării structurii cuaternare a hemoglobinei prin oxigenare

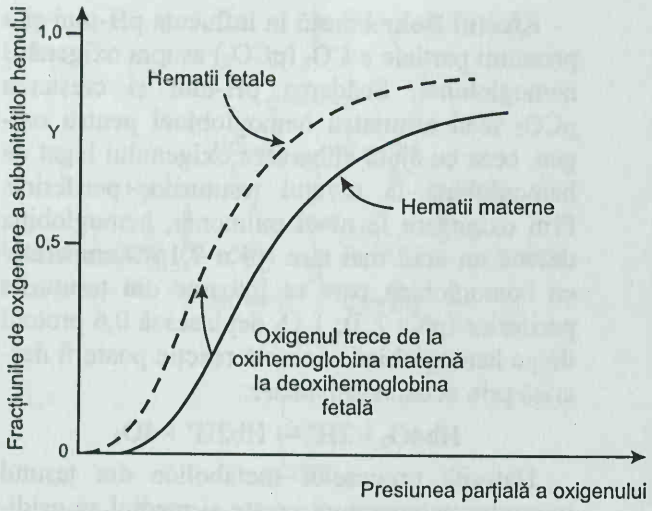


Figura 5.6. Curbele de disociere ale oxihemoglobinelor maternă şi fetală

Aproximativ 15 % din CO_2 transportat în sânge este legat direct de lanţul de globină, iar 5% este dizolvat în plasmă.

Efectul 2,3-difosfogliceratului asupra moleculei de hemoglobină constă în scăderea afinităţii faţă de oxigen de 26 de ori. Acest compus se sintetizează în cantităţi mari în eritrocite (provine dintr-un intermediar glicolitic: 1,3-difosfoglicerat) prin şuntul Rapaport-Luebering, şi are rolul de a poziţiona curba de disociere a oxihemoglobinei în intervalul fiziologic de pO_2, printr-o interacţiune între centrii de legare ai 2,3-DPG şi centrii de oxigenare. Cele 4 sarcini negative ale 2,3-DPG se leagă ionic de protomerii beta ai deoxihemoglobinei, facilitând eliberarea oxigenului, prin stabilizarea formei deoxi a Hb. 2,3-DPG este descompus în mod ireversibil în sângele conservat.

Hemoglobina fetală leagă mai slab 2,3-DPG decât Hb maternă, astfel are afinitatea pentru oxigen mai mare, şi poate facilita transferul de oxigen din sângele matern spre cel fetal (*Figura 5.6*). Explicaţia biochimică a acestei diferenţe constă într-o diferenţă structurală: HbF are în poziţia H21 a lanţului γ un rest de serină în loc de histidina din lanţul β (în HbA), astfel nu mai poate forma o punte salină cu 2,3-DPG.

Adaptarea la mare altitudine are la bază (alături de o creştere uşoară a numărului de eritrocite şi a concentraţiei de hemoglobină eritrocitară) sinteza crescută de 2,3-DPG în eritrocite, care repoziţionează curba de disociere a oxihemoglobinei în funcţie de valorile mai mici ale pO_2. Răul de altitudine se datorează vitezei relativ mici de sinteză a 2,3-difosfogliceratului.

5.1.3 Derivaţii hemoglobinei

5.1.3.1 Derivaţi fiziologici

Oxihemoglobinele. Hemoglobina poate lega 1, 2, 3 sau 4 molecule de oxigen. Prin oxigenare se schimbă culoarea sângelui din purpuriu închis (sânge venos) în roşu aprins (sânge arterial). OxiHb şi deoxiHb au spectre de absorbţie diferite, astfel ele se pot doza spectrofotometric. Toate hemoproteinele prezintă şi o bandă de absorbţie comună la 400 nm, denumită bandă Soret.

Carbaminohemoglobina. Aproximativ 15% din cantitatea totală de CO_2 din sânge se combină cu Hb, reacţionând cu resturile de valină de la capătul amino terminal al celor 4 protomeri ai hemoglobinei:

$$Hb\text{-}Val\text{-}NH_2 + CO_2 \rightarrow Hb\text{-}Val\text{-}NH\text{-}COOH.$$

Oxigenul deplasează CO_2 de pe Hb, fenomen denumit efect Haldane. CO_2 este componenta acidă şi respiratorie a sistemului tampon al bicarbonaţilor.

5.1.3.2 Derivaţi patologici

Carboxihemoglobina (COHb). Afinitatea monoxidului de carbon (CO) pentru Hb este de 218 de ori mai mare decât a oxigenului, cauzând reducerea concentraţiei de oxihemoglobină şi scăderea cantităţii de oxigen disponibil pentru ţesuturi. Eliberarea CO din carboxihemoglobină este un proces mult mai lent comparativ cu disocierea oxigenului din oxihemoglobină. În mod normal, mai puţin de 2% din cantitatea totală de Hb a locuitorilor din mediul (mai poluat) urban, se găseşte sub formă de COHb, în sângele fumătorilor însă, proporţia fiind mult mai mare (până la 10%). În cazul intoxicaţiei cu CO, prin creşterea pO_2 în aerul inspirat, se poate îndepărta acest compus de pe hemoglobină.

Methemoglobina (MetHb). În acest tip de hemoglobină fierul feros (Fe^{2+}) este oxidat în fier feric (Fe^{3+}), astfel pierzând capacitatea de a transporta oxigenul. În condiţii normale doar 1% din Hb prezentă în sânge se găseşte sub formă de methemoglobină, acest procent foarte mic este menţinut de methemoglobin-reductază, care converteşte fierul feric în fier feros ($Fe^{3+} + 1e^- \rightarrow Fe^{2+}$). La persoanele cu deficit înnăscut sau dobândit (prin ingestia masivă a unor substanţe, de ex. sulfonamide) de methemoglobin-reductază, cantitatea de MetHb creşte, manifestarea clinică majoră fiind cianoza.

Nitraţii prezenţi în apa consumată în concentraţii de peste 10 mg/l pot provoca, în special la sugarii cu vârsta sub 6 luni, stare de methemoglobinemie („blue baby sindrome"). Valoarea pH-ului din sucul gastric al acestora este mult mai ridicat comparativ cu cel al adulţilor, în aceste condiţii bacteriile care convertesc nitraţii în nitriţi pot prolifera uşor. Ajuns în sânge, nitritul oxidează fierul în methemoglobină, iar copiii mici sunt deficitari în activitatea methemoglobin reductazei. Clinic apare cianoză la nivelul mâinii şi a picioarelor, respectiv în zona perioralã, asociat frecvent cu tulburări respiratorii, diaree, vome, uneori letargie, hipersalivaţie, tulburări de conştienţă, convulsii şi chiar moarte. Schimbarea sursei de apă rezolvă de obicei problema în decurs de 2-3 zile, în cazuri grave se recurge la administrare de albastru de metilen intravenos.

În formele toxice, ca urmare a hemolizei, apare methemalbumina, care determină culoarea brună a plasmei; urina poate fi de asemenea colorată în brun, datorită eliminării pe această cale a MetHb libere. În hemolizele masive poate apare chiar **hematină** liberă (hem oxidat) sanguină. În formele toxice (nu şi în cele congenitale) administrarea de acid ascorbic sau albastru de metilen, contribuie la reducerea fierului din structura MetHb.

Sulfhemoglobina este un derivat verde al hemoglobinei, care apare după expunerea la compuşi solubili sau la medicamente cu sulf, când un atom de sulf este încorporat în inelul porfirinic al hemoglobinei. Capacitatea hemoglobinei de a lega oxigenul scade, dar capacitatea de a ceda oxigenul ţesuturilor este crescută – deplasare la dreapta a curbei de oxigenare a hemoglobinei (efect similar cu al 2,3 - DPG).

Glicohemoglobina. Proporţional cu valorile glicemiei, are loc un proces neenzimatic de glicozilare a tuturor proteinelor plasmatice; având durata de viaţă a hematiilor (3-4 luni), Hb este proteina preferată pentru studiul fenomenului de glicozilare în monitorizarea diabeticilor. Grupările amino terminale ale lanţurilor β reacţionează cu glucoza, formând baze Schiff şi apoi un compus mai stabil chimic – compus Amadori (HbA1c). Hemoglobina glicozilată este un parametru foarte util în urmărirea echilibrului metabolic glucidic al pacienţilor diabetici, valorile normale fiind cuprinse între 4-6% (se exprimă în procente din Hb totală). Cu cât glicemiile pacientului în lunile precedente analizei au fost mai ridicate, cu atât nivelul HbA1c va fi mai mare. Obiectivul tratamentului la diabetici este menţinerea valorii HbA1c sub 7%. Între 7-9% vorbim despre echilibru metabolic satisfăcător, peste 9-12% considerăm echilibrul precar şi tratamentul trebuie revizuit, iar peste 12% este necesară intervenţie promptă, fiind pericol iminent de decompensare, cu apariţia complicaţiilor acute ale diabetului zaharat, iar pe termen lung creşte riscul complicaţiilor cronice.

5.1.4 Porfirine – Porfirii

5.1.4.1 Porfirine şi tulburări ale metabolismului acestora

Porfiriile reprezintă un grup de boli în care există un deficit al unei enzime implicate în biosinteza hemului, ducând la acumularea unor intermediari ai acestei căi metabolice. Aceşti intermediari sunt excretaţi în cantităţi excesive prin urină, fecale sau ambele. Simptomatologia bolii depinde de natura precursorului de hem care se acumulează. În porfiriile acute excesul de precursori porfirinici (acidul 5-amino-levulinic şi porfobilinogenul) se asociază cu manifestări neuroviscerale episodice, aceste acutizări ale bolii fiind provocate de unele medicamente, factori hormonali, alcool, inaniţie, stres sau infecţii. În porfiriile non-acute şi în cele acute cu manifestări la nivelul pielii, acumularea porfirinelor duce la fotosensibilizare şi leziuni cutanate.

Diagnosticul acestor boli depinde în mare măsură de analizele de laborator care pot demonstra acumularea intermediarului respectiv în proba biologică adecvată. Progresele tehnice în domeniul geneticii moleculare fac posibilă investigarea porfiriilor la nivel molecular şi oferă informaţii valoroase în investigarea familiilor cu porfirii.

5.1.4.2 Fiziologia sintezei hemului

Denumirea porfirinelor provine din cuvântul grecesc porphyra (purpuriu), datorită culorii acestor structuri tetrapirolice cu duble legături conjugate. Porfirinogenii la rândul lor nu conţin duble legături conjugate astfel sunt incolori.

Biosinteza hemului porneşte de la succinil-CoA intramitocondrială (intermediar al ciclului citric) şi glicină, se formează acidul δ-amino levulinic, apoi procesul continuă în citoplasmă prin formarea progresivă a nucleului tetrapirolic, iar ultimele etape au loc din nou în mitocondrie.

Enzima cheie a procesului este ALA-sintaza, care reglează viteza biosintezei hemului. Produsul final, hemul este inhibitor alosteric al acestei

enzime, dar ea este supusă şi reglării prin inducție-represie enzimatică. Numeroase medicamente (de ex. barbituricele) induc ALA-sintaza pentru creşterea producției de citocrom P_{450}, care participă la detoxifierea organismului.

5.1.4.3 Aspecte patologice

Porfiriile sunt boli genetice dominant autosomale, cu excepția porfiriei eritropoietice congenitale, care este de tip recesiv. Deficitele enzimatice care duc la diferitele tipuri de porfirii sunt redate în *Figura 5.7.*

Semnele şi simptomele clinice care apar în porfirii se datorează fie acumulării de metaboliți care preced blocajul enzimatic, fie deficienței produşilor metabolici care succed acest blocaj. Astfel, în porfiria acută intermitentă blocajul enzimatic determină acumularea ALA şi PBG în lichidele şi țesuturile organismului. Efectul toxicității acestor metaboliți asupra nervilor abdominali şi sistemului nervos central determină simptome specifice precum dureri abdominale şi tulburări neuropsihice, datorate în mare măsură similitudinii structurale între neurotransmițătorul GABA şi intermediarul δ-ALA, cel din urmă acționând ca inhibitor competitiv, blocând parțial acțiunea acidului gama-amino-butiric asupra receptorilor săi.

Blocajele enzimatice care determină acumularea porfirinogenilor cauzează fotosensibilitatea. Expunerea la lumină (~400 nm) a porfirinogenilor îi aduce într-o stare excitată în care reacționând cu oxigenul, rezultă radicali ai acestuia, care produc liza lizozomilor şi a altor organite celulare cu eliberare de enzime care cauzează alterări ale pielii (cicatrici). Cea mai des întâlnită formă patologică este *porfiria cutanea tarda.*

Porfiriile cutanate se manifestă printr-o varietate de leziuni tegumentare de tip acut (eritem solar, leziuni veziculare, buloase sau ulcerate) respectiv de tip cronic (zone de atrofie sau hiperpigmentare, cicatrici, hipertricoză facială).

Porfiriile pot fi clasificate pe baza organului/celulelor preponderent afectate, unde este activă sinteza hemului (măduva osoasă hematogenă şi ficatul), astfel porfiriile pot fi eritropoietice, hepatice şi eritrohepatice. Exemple de porfirii, simptomele acestora şi analizele de laborator corespunzătoare sunt redate în *Tabelul 5.I.*

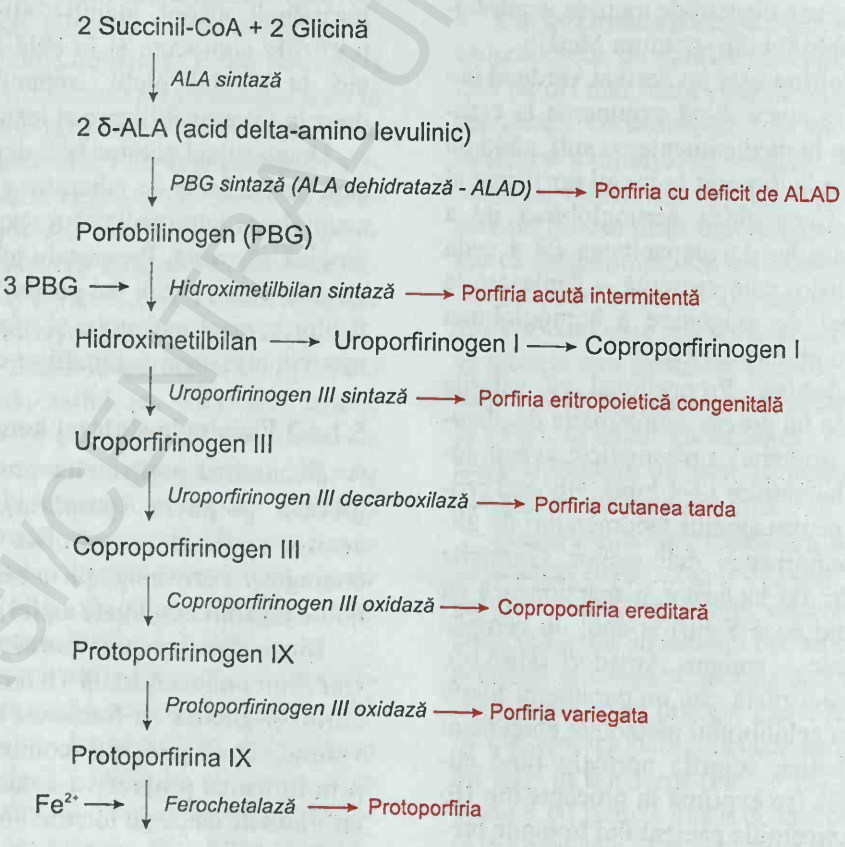


Figura 5.7. Etapele biosintezei hemului şi bolile apărute în urma deficitelor enzimatice

Tabelul 5.I. Tipuri de porfirii – simptome şi date de laborator

Tipul (clasa) de porfirii	Simptome	Teste de laborator
Porfiria intermitentă acută	Dureri abdominale, tulburări neuropsihice	PBG urinar + (prezent) Uroporfirină urinară +
Porfiria congenitală (eritropoietică)	Fotosensibilitate	PBG urinar – (absent) Uroporfirină urinară +
Porfiria cutanea tarda (hepatică)	Fotosensibilitate	PBG urinar – Uroporfirină urinară +
Coproporfiria ereditară (hepatică)	Fotosensibilitate, dureri abdominale, tulburări neuropsihice	PBG urinar + Uroporfirină urinară + Coproporfirină fecală +
Porfiria variegata (hepatică)	Fotosensibilitate, dureri abdominale, tulburări neuropsihice	PBG urinar + Uroporfirină urinară + Coproporfirină fecală +
Protoporfiria (eritrohepatică)	Fotosensibilitate	Protoporfirină fecală + Protoporfirină eritrocitară +

În prezent, tratamentul porfiriilor este simptomatic, dar în viitor sunt speranţe legate de terapia genică. Bolnavii cu porfirii trebuie să evite alcoolul şi medicamentele inductoare de citocrom P_{450}. Fumatul constituie o sursă de hidrocarburi aromatice care stimulează citocromul P_{450} din ficat, crescând astfel riscul acutizării porfiriei. Pacienţii cu fotosensibilitate pot utiliza beta-carotenul sau alţi antioxidanţi pentru prevenirea formării radicalilor liberi, diminuând astfel simptomele bolii, respectiv se recomandă evitarea expunerii la soare. În cazul pacienţilor prezentând porfirii cu manifestări neuroviscerale în etapa de acutizare se recomandă administrare de glucoză intravenos (300 g/zi) cu efect inhibitor asupra ALA-sintazei, iar tratamentul de elecţie este administrarea intravenoasă de hematină (sau hem arginate), care suprimă hiperproducţia de ALA şi PBG prin efectul inhibitor asupra ALA-sintazei hepatice. Se mai utilizează analogi sintetici ai hemului care inhibă hem oxigenaza. Bolile hepatice pot induce de asemenea manifestările clinice la pacienţii cu porfirii, aşadar tratamentul hepatopatiilor este benefică în ameliorarea simptomelor şi prevenirea recidivelor.

Pentru diagnosticul porfiriilor au fost propuse teste de primă intenţie (determinarea precursorilor porfirinici ca ALA şi PBG urinar la pacienţii cu simptome neuroviscerale şi măsurarea fluorometrică a porfirinelor totale din plasmă în cazul suspiciunii de porfirie cutanată) şi analize de linia a doua, mai costisitoare (de ex. HPLC), care se aplică dacă unul din testele de screening au fost pozitive, în vederea determinării tipului de porfirie, lucru esenţial pentru tratament şi sfatul genetic.

Anomalii ale metabolismului porfirinelor pot fi cauzate de intoxicaţiile cu plumb (plumbul înlocuieşte zincul din centrul activ al ALAD), arsenice sau alte metale grele, tirozinemii cu acumulare de succinilacetonă (inhibitor competitiv al ALAD), insuficienţă renală (eliminare deficitară a porfirinelor hidrosolubile), tulburări hepatobiliare, etc.

5.1.5 Polimorfismul hemoglobinelor. Hemoglobinopatiile

Hemoglobina **HbA** ($\alpha_2\beta_2$) reprezintă peste 95% din Hb circulantă a adultului. În afară de această formă, sângele mai conţine 2-3 % **HbA_2** ($\alpha_2\delta_2$) şi mai puţin de 1 % HbF (hemoglobină fetală) cu formula oligomerică $\alpha_2\gamma_2$.

La naştere, **HbF** reprezintă 80 % din Hb totală, în decurs de 1 an scăzând apoi sub 1%. În afară de hemoglobinele adultului şi HbF, mai există 3 tipuri de hemoglobine embrionare: **Gower I** ($\zeta_2\varepsilon_2$), **Gower II** ($\alpha_2\varepsilon_2$) şi **Portland** ($\zeta_2\gamma_2$). În *Figura 5.8* este prezentată evoluţia sintezei protomerilor hemoglobinei în perioada pre – şi perinatală. Se observă că intensificarea sintezei protomerului β coincide cu reducerea sintezei protomerului γ, ceea ce reprezintă o înlocuire a HbF cu HbA.

Mutaţiile hemoglobinei pot fi calitative (modificarea punctiformă a secvenţei de aminoacizi din cadrul lanţului globinic – substituţii, inserţii, deleţii, sau diferenţe mai mari, lanţuri prea scurte sau prea lungi datorate localizării defectuoase ale codonului stop, etc.) sau cantitative (deficitul de sinteză a unei catene întregi). Mutaţiile calitative

pot interesa suprafaţa moleculei de hemoglobină, sau pot fi în interior, îndeosebi la nivelul pungii de oxigenare. S-au evidenţiat mai multe sute de anomalii ale moleculei de hemoglobină, decelabile prin electroforeză.

5.1.5.1 Hemoglobinopatii calitative

Dintre mutaţiile de suprafaţă, cea mai răspândită este mutaţia la nivelul lanţurilor β în poziţia 6, unde în locul unui rest de glutamat apare valină. Hemoglobina rezultată se numeşte **HbS**, notată prescurtat HbS (*Gluβ6→ Val*), iar patologia rezultată - siclemie, anemie falciformă.

HbA: Val-His-Leu-Thr-Pro-**Glu**-Glu-Lys-
HbS: Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Glu-Lys-
Poziţia: 1 2 3 4 5 **6** 7 8

Pe suprafaţa HbS, în locul unui radical polar (Glu) se găseşte unul nepolar (Val), astfel tetramerul HbS are în exterior două zone de asociere prin forţe hidrofobe, create de radicalii Val β6, precum şi două situsuri hidrofobe, complementare steric cu acestea, situate între segmentele E şi F (Ala 70, Phe 85, Leu 88) ale catenelor β. Datorită potrivirii sterice a situsurilor Val β6 în situsurile complementare, moleculele de deoxi-HbS au tendinţa să se asocieze (polimerizeze) prin forţe hidrofobe (*Figura 5.9*).

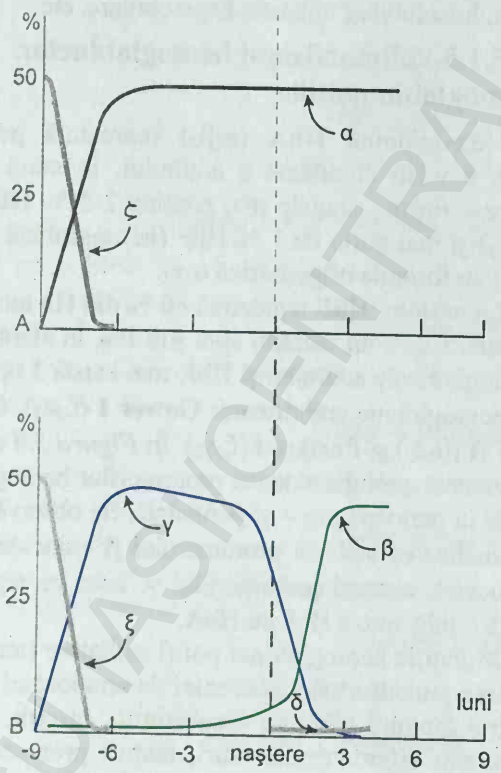


Figura 5.8. Variaţia sintezei tipurilor de globină pe parcursul vieţii intrauterine şi în primul an după naştere

Precipitatele fibrilare de polideoxi-HbS rezultate prin polimerizare deformează eritrocitele, acestea adoptând forma de seceră (*falcium* în limba latină). Moleculele de oxi-HbS nu prezintă pe suprafaţa lor zone complementare, astfel ele nu se pot polimeriza. Precipitatele de polideoxi-HbS se dizolvă prin oxigenare. Procesul de polimerizare al deoxi-HbS este unul de nucleaţie. Etapa limitatoare de viteză, mai lentă, reprezintă formarea unui nucleu prin asocierea a cca. 10 molecule de deoxi-HbS, în jurul căruia vor creşte în scurt timp fibrele de polideoxi-HbS.

Un eritrocit conţinând deoxi-HbS nu suferă deformare dacă timpul de nucleaţie este mai lung decât timpul necesar deplasării eritrocitelor de la capilarele periferice la alveolele pulmonare, unde se pot reoxigena. Timpul de nucleaţie este dependentă de concentraţia deoxi-HbS. Heterozigoţii, la care deoxi-HbS reprezintă 50 % din total, au doar 1 % din eritrocite cu aspect falciform. În condiţiile privării de O_2 (la altitudine mare sau la efort) creşte concentraţia formei deoxigenate a HbS, scade timpul de nucleaţie, cauzând creşterea proporţiei eritrocitelor falciforme, astfel heterozigoţii devin simptomatici. Efectul inhibitor pe care îl exercită deoxi-HbA din sângele heterozigoţilor asupra procesului de polimerizare a deoxi-HbS este un factor important datorită căruia heterozigoţii prezintă un timp de nucleaţie relativ lung comparativ cu homozigoţii.

În urma precipitării HbS din eritrocite membrana lor devine mai fragilă şi mai rigidă, datorită deformabilităţii scăzute ele nu pot trece uşor prin capilare şi datorită formei lor agregă, determinând insuficienţa circulatorie a organelor, care crează hipoxie ce agravează starea bolnavului. Fragilizarea are drept consecinţă reducerea timpul de viaţă a eritrocitelor, provocând hemoliza timpurie a acestora, ducând la apariţia unei anemii hemolitice, dar care nu deranjează viaţa normală a acestor heterozigoţi. Heterozigoţii şi homozigoţii HbS sunt rezistenţi la malarie, afecţiune larg răspândită în Africa şi ţările riverane mării Mediterane - boală parazitară provocată de *Plasmodium falciparum*, agentul patogen inoculat de ţânţarul anofel. Dacă eritrocitele au HbS-mutantă ele nu pot fi infectate. Rezistenţa la malarie a acestei forme patologice de hemoglobină a determinat o selecţie în populaţia regiunilor afectate de această boală parazitară.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există zone şi în România, mai ales în sudul ţării, unde putem întâlni bolnavi suferind de siclemie. Diagnosticul se poate pune prenatal, iar la nou-născuţi semne precoce ale bolii pot fi tumefieri ale membrelor superioare în primele 2-6 zile. La gravidele afectate de hemoglobinopatie S poate apare o anemie severă, insuficienţă cardiacă, preeclampsie. La nevoie, acestor femei li se va administra concentrat eritrocitar.

Alte mutaţii cu frecvenţă destul de ridicată sunt **hemoglobinopatiile C** (*Gluβ6→Lys)* în Africa, **D** (*Gluβ121→Gln)* în Iran (Punjab), India şi **E** (*Gluβ26→Lys)* în Asia, la care substituţiile interesează câte un rest de acid glutamic din diferite poziţii ale catenei β.

Modificarea secvenţei de aminoacizi în poziţii din interiorul hemoglobinei destabilizează toată molecula. Produşii proveniţi din degradarea acestor hemoglobine mutante formează *corpusculi Heinz*, precipitate granulare adsorbite pe suprafaţa internă a membranei eritrocitare, cres-

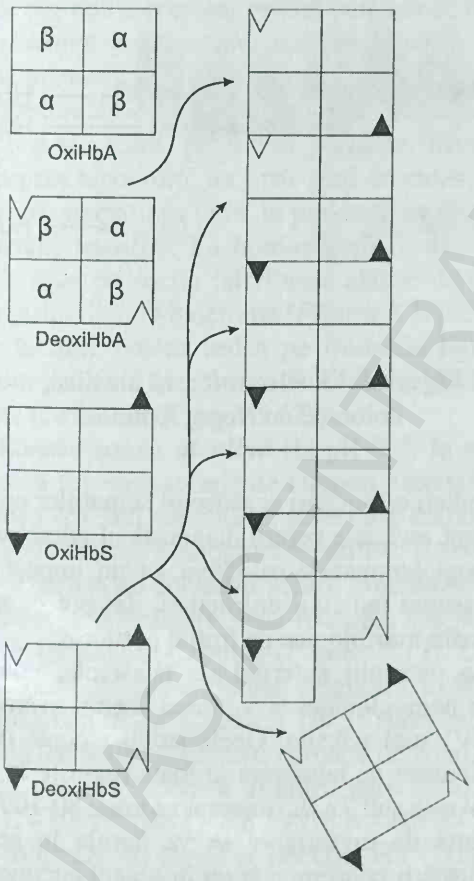


Figura 5.9. Formarea polimerilor deoxiHbS. Triunghiurile pline sunt situsuri hidrofobe de asociere, cele goale sunt situsuri hidrofobe complementare

când astfel permeabilitatea acesteia, provocând hemoliză prematură manifestată prin **anemie hemolitică**. Un exemplu tipic este hemoglobinopatia *Pheβ42 → Ser.* Înlocuirea Phe cu Ser din punga hidrofobă face posibilă intrarea apei, ceea ce determină ieşirea hemului din pungă.

Substituţiile cu tirozină ale unui radical de histidină de la nivelul centrului de legare a O_2 (E7 sau F8) - care stabilizează hemul în stare oxidată (Fe^{3+}) - anulează capacitatea de oxigenare a hemoglobinei, astfel aceste mutaţii sunt asociate cu **methemoglobinemie**. Bolnavii prezintă cianoză datorită prezenţei deoxi-HbM în sângele arterial. Methemoglobina în cantităţi mari se poate forma şi în cursul vieţii, forma nedeterminată genetic apare la copii mici după consum de apă bogată în nitriţi şi nitraţi.

5.1.5.2 Hemoglobinopatii cantitative

În talasemii anomalia priveşte rata de sinteză a unor protomeri, provocând anemii de severitate diferită. Este posibil diagnosticul prenatal în aceste boli. Starea de homozigot de **talasemie α** (lipsa totală a sintezei catenelor α) este incompatibilă cu viaţa (apare hydrops fetal), fiindcă toate tipurile de hemoglobină ale adultului (HbA, A_2), respectiv HbF şi Gower II conţin acest protomer.

În cazul **talasemiei β** gravitatea deficitului de sinteză poate fi diferită în funcţie de starea de homo- sau heterozigot. Această boală oferă de asemenea rezistenţă la malarie.

5.1.5.3Metode de investigare a anomaliilor hemoglobinei

Pentru decelarea hemoglobinopatiilor, se recomandă o serie de investigaţii printre care se numără în **prima etapă**: hemograma completă, electroforeza la pH 9,2, teste de solubilitate şi de siclizare, respectiv cuantificarea HbA_2 şi HbF. Dacă în urma acestor analize iniţiale se constată anomalii ale hemoglobinei, **etapa a doua** constă din electroforeză la pH 6,2, separarea lanţurilor globinice, focusare izoelectrică, etc. Dacă se suspectează prezenţa unei Hb instabile sau cu afinitate alterată pentru oxigen, se recomandă încălzirea probei şi testul de stabilitate cu izopropanol. În completarea acestor analize, este necesară investigarea metabolismului fierului la pacientul respectiv, prin dozarea feritinei sau determinarea indexului de saturare a transferinei.

Tehnicile analitice utilizate în studiul hemoglobinopatiilor includ în afară de cele enumerate,

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

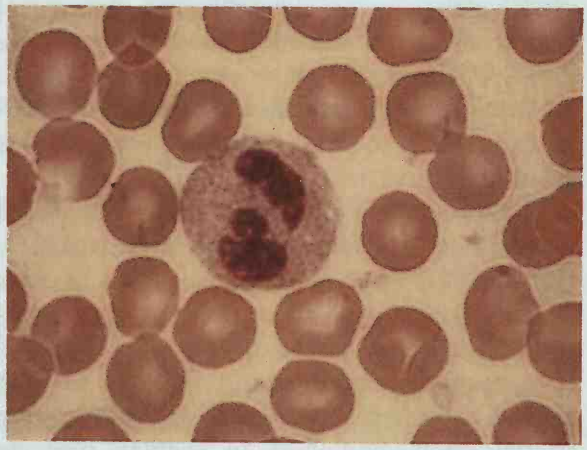


Figura 5.10. Frotiu periferic normal (colorație MGG) cu multe hematii de aspect fiziologic (normocite), un leucocit polimorfonuclear şi câteva plachete (trombocite).

Figura 5.11. Frotiu periferic la un heterozigot de HbS: hematie în seceră.

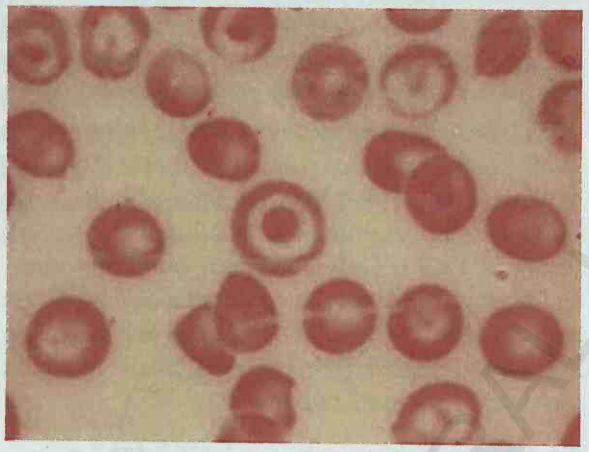


Figura 5.12. Frotiu periferic la un heterozigot cu Hb C: se observă eritrocite în țintă.

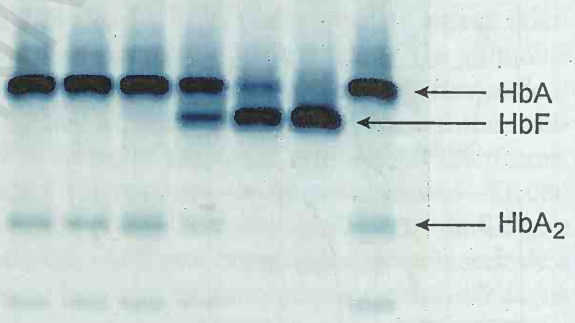


Figura 5.13. Electroforeză alcalină, colorație cu Negru Amido

metode imunologice şi tehnici foarte sensibile de separare, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă presiune (HPLC), electroforeza capilară, spectrometria de masă şi analiza ADN-ului.

Recoltarea probelor

Probele de sânge pentru investigarea unei eventuale hemoglobinopatii se recoltează pe anticoagulant, preferabil pe EDTA. Pentru a minimaliza formarea produşilor de degradare, se recomandă păstrarea probelor de sânge la 4°C şi prelucrarea probelor în termen de 5 zile.

Elemente de diagnostic în hemoglobinopatii

Hemograma completă constă din numărarea elementelor figurate (hematii, leucocite, plachete), calcularea indicilor eritrocitari şi analiza frotiului periferic.

Indicii eritrocitari şi aspectul hematiilor pe frotiu sunt esențiale pentru diagnosticul talasemiilor. Hemoglobinopatiile calitative au un impact mai mic asupra indicilor eritrocitari, dar pot prezenta anomalii morfologice pe frotiul periferic.

La pacienții suferind de talasemie, concentrația hemoglobinei şi volumul mediu eritrocitar (MCV) sunt scăzute. Unele studii recente ridică suspiciunea de talasemie în toate cazurile în care MCV este sub 72 fL (interval normal: 80-100 fL). Schema de investigare se va derula în sensul confirmării talasemiei şi nu în sensul anemiei feriprive dacă media hemoglobinei corpusculare (MCH) se situează sub 27 pg (interval normal 26-35 pg). În talasemii numărul hematiilor este peste intervalul normal sau în zona superioară a

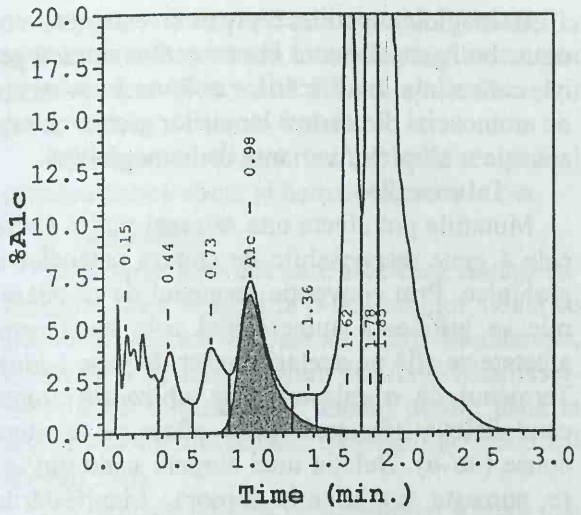


Figura 5.14. Cromatogramă HPLC la un heterozigot cu Hb E

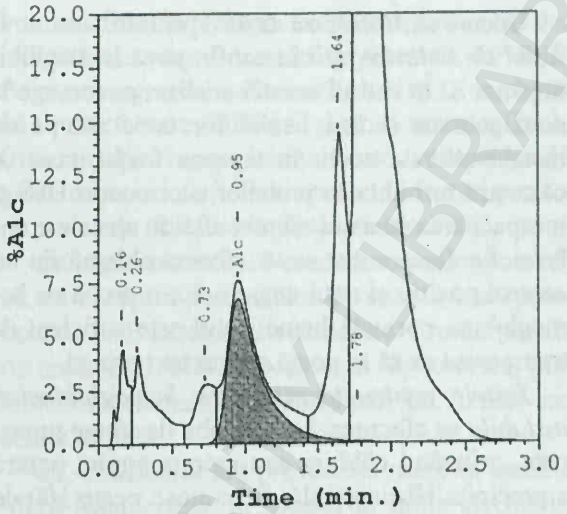


Figura 5.15. Cromatogramă HPLC la un pacient diabetic

valorilor fiziologice, în timp ce parametrul este normal în majoritatea hemoglobinopatiilor calitative şi scăzut în anemii feriprive respectiv, în anemiile din bolile cronice, paralel putându-se observa scăderea concentraţiei hemoglobinei. În anemiile microcitare, inclusiv cele prin deficit de fier, dimensiunile hematiilor variază (anizocitoză).

În β-talasemii, pe frotiul periferic, hematiile au aspect hipocrom, un înalt grad de anizopoikilocitoză, hematii în ţintă, în picătură, ovalocite şi punctaţii bazofile. La homozigoţii de Hb S pe frotiu apar eritrocite falciforme alături de sferocite şi microcite hipocrome (*Figura 5.11*). Eritrocite în ţintă putem vedea pe frotiurile homozigoţilor cu Hb E şi Hb C, alături de incluzii cristaline (cu Hb C) (*Figura 5.12*).

Electroforeza *alcalină* (la pH 9,2) în gel de agaroză folosind soluţie de tampon barbital, este metoda cea mai comună de screening iniţial pentru identificarea hemoglobinopatiilor. Benzile se pot vizualiza cu coloranţi pentru proteine cum ar fi Ponceau S (culoare roşie-rozacee) sau Amido Black (colorație albastră) (*Figura 5.13*). Diversele forme de hemoglobină migrează în funcţie de încărcătura lor electrică, Hb H fiind cea mai rapidă (se situează cel mai aproape de anod). Ordinea descrescătoare a migrării spre anod este: Hb H - Hb N - Hb I - Hb J - Hb A - Hb F - Hb S (co-migrează cu Hb D şi Hb G) - Hb C (co-migrează cu Hb E, O, A_2).

Electroforeza *acidă* (la pH 6,4) utilizând tampon citrat, se aplică atunci când pe traseul de electroforeză alcalină s-a evidenţiat o bandă de hemoglobină anormală. Mediul preferat este gel de agaroză, cel mai des se utilizează colorantul Acid Violet. Ordinea descrescătoare a migrării spre anod este Hb C - Hb S - Hb A şi Hb F. Hemoglobinele D, G, I, J, O, A_2 şi E co-migrează cu Hb A. Pe baza poziţiei benzilor obţinute la cele două tipuri de electroforeză, se poate pune diagnosticul prezumptiv de hemoglobinopatie.

Electroforeza *cu focusare izoelectrică*. Diagnosticul definitiv, inclusiv cuantificarea diverselor tipuri de hemoglobină cu ajutorul densitometriei, se poate realiza cu ajutorul electroforezei cu focusare izoelectrică, care are putere de rezoluţie mai mare decât electroforeza convenţională, dar este mai laborioasă şi mai costisitoare. La această metodă se utilizează geluri de poliacrilamidă sau acetat de celuloză, şi se realizează un gradient de pH cu ajutorul unor materiale amfotere cu pH-uri diferite incluse în benzi în cadrul gelului. O variantă automatizată a acestei metode este electroforeza *capilară de focalizare izoelectrică.*

Cromatografia lichidă de înaltă performanţă (HPLC), utilizând o răşină schimbătoare de cationi, ne oferă posibilitatea cuantificării hemoglobinei F, eventual şi a formei A_2, respectiv poate evidenţia o serie de alte variante patologice de hemoglobină (Hb S, D, E, C) pe baza timpului lor diferit de eluţie, şi poate releva fenotipurile de talasemie α (*Figura 5.14*). Această metodă se poate utiliza şi pentru determinarea valorii hemoglobinei glicozilate (HbA1c) la pacienţii diabetici cu scopul evaluării echilibrului metabolic glucidic (*Figura 5.15*).

Uneori se utilizează **teste speciale** cum ar fi *testul de siclizare*, util în confirmarea hemoglobinopatiei S. În cadrul acestei analize, se recurge la deoxigenarea şi liza hematiilor cu o soluţie de metabisulfit de sodiu în tampon fosfat, ceea ce cauzează turbiditatea probelor care conţin HbS şi incapacitatea de a citi un text aflat în spatele eprubetei. La fiecare test se va efectua obligatoriu un control pozitiv şi unul negativ. La o probă cu hemoglobina normală hemolizatul este suficient de transparent ca să se poată citi un text prin el.

Testele pentru identificarea hemoglobinelor instabile se efectuează din probe de sânge proaspete, utilizând căldura sau izopropanolul pentru a precipita Hb instabilă. Se cunosc peste 100 de hemoglobine instabile, rezultate ale unor mutaţii punctiforme de înlocuire a unor resturi de aminoacizi apolari cu cei polari în cadrul lanţurilor α sau β la nivelul pungii hidrofobe a hemului. Izopropanolul apolar slăbeşte legăturile din interiorul moleculei de Hb, diminuând stabilitatea acesteia. Hb normală (Hb A) precipită în 40 de minute la 37°C în prezenţa soluţiei de 17% de izopropanol în tampon TRIS de pH 7,4. Hemoglobinele instabile precipită de regulă în decurs de 5 minute în aceste condiţii. Hemoglobina normală este stabilă în cazul încălzirii la 50°C, în timp ce hemoglobinele instabile precipită în diverse cantităţi la această temperatură.

În cadrul *analizei lanţurilor de globină,* prima etapă este disocierea hemului de catenele polipeptidice din hemolizat folosind ureea şi ditiotreitolul. Lanţurile globinice sunt apoi separate prin electroforeză la pH acid şi bazic. Metoda HPLC poate fi utilizat de asemenea pentru separare. Lanţurile globinice vor fi identificate prin compararea timpului lor de retenţie sau a mobilităţii lor electroforetice cu probe de referinţă.

5.1.5.4 Aspecte clinice

Talasemiile şi hemoglobinopatiile constituie două categorii distincte de boli genetice, în ciuda unor manifestări clinice similare cum ar fi anemia de diferite grade de severitate.

Talasemiile au la bază tulburarea sintezei unor lanţuri globinice induse de o varietate de cauze, cum ar fi deleţii ale genelor, mutaţii nonsens, mutaţii care afectează transcripţia, etc. Denumirea lor provine din cuvântul grecesc *thalassa* (= mare), fiindcă primele cazuri decelate de β-talasemie au fost descrise la copii din zona Mării Mediterane.

Hemoglobinopatiile reprezintă cele mai comune boli genetice care interesează o singură genă, consecinţa modificărilor apărute în secvenţa de aminoacizi din cadrul lanţurilor globinice este apariţia multiplelor variante de hemoglobină.

α-Talasemiile

Mutaţiile pot afecta una sau mai multe dintre cele 4 gene responsabile de sinteza catenelor α globinice. Prin convenţie termenul de α^0-talasemie se utilizează atunci când cele două gene afectate se află pe acelaşi cluster de gene (-/αα). Termenul de α^+-talasemie se utilizează atunci când deleţia afectează gene aflate pe clustere opuse (-α/-α). Deleţia unei singure gene (αα/-α) se numeşte α-talasemie minoră. Manifestările clinice ale α-talasemiei variază de la stări incompatibile cu viaţa până la anemii uşoare.

Hemoglobina Bart rezultă în urma deleţiei tuturor celor 4 gene responsabile de sinteza catenelor α globinice, astfel organismul respectiv este incapabil să producă lanţuri α globinice necesare sintezei Hb A, F şi A_2. La feţii afectaţi apare un exces de lanţuri γ-globinice care se asociază formând un tetramer denumit Hb Bart. Gravidele a căror feţi suferă de această boală prezintă de regulă între săptămânile 20 şi 26 de gestaţie hipertensiune şi polihidramnios, iar ecografia relevă hydrops fetal. Probele de sânge prelevate de la aceşti feţi prin cordocenteză arată de regulă anemie severă (Hb sub 8 g/dL). Este important să se excludă celelalte cauze de hydrops fetal prin efectuarea testelor TORCH (toxoplasmoză, rubeolă, citomegalovirus şi herpes simplex). Hydropsul fetal duce aproape invariabil la deces intrauterin sau în perioada de nou născut (la câteva ore după naştere). Tratamentul cu transfuzii intrauterine are un succes foarte limitat, pot apare numeroase complicaţii cum ar fi retardarea în creştere sau leziuni cerebrale severe datorate probabil anemiei severe intrauterine.

Boala hemoglobinei H este cauzată de deleţia la nivelul a trei gene α globinice (-/-α) şi se caracterizează printr-o anemie cronică de severitate variabilă cu formarea unor tetrameri de catene β cu solubilitate redusă denumite Hb H. Pe frotiu se pot observa hematii conţinând incluzii punctiforme. Tratament cu transfuzii este indicat doar în condiţii speciale (boli acute, sarcină, expunere la medicamente sau oxidanţi care destabilizează Hb H, provocând precipitarea acestei forme patologice de hemoglobină).

α-Talasemia majoră este rezultatul deleţiei la nivelul a două gene ale lanţurilor α. Acestea pot fi deleţii cis (-/αα) sau trans (-α/-α). Pacienţii prezintă doar o anemie uşoară.

α-Talasemia minoră (-α/αα) este de obicei asimptomatică clinic şi hematologic.

β-Talasemiile

Tulburarea genetică care afectează sinteza catenelor β duce la apariţia β-talasemiilor, boală cu frecvenţă ridicată în bazinul Mării Mediterane, în Africa şi în unele regiuni din Asia. Manifestările clinice variază de la anemii uşoare până la condiţii severe necesitând transfuzii pe parcursul întregii vieţi.

β-Talasemia majoră (β^0-talasemia) rezultă mai ales prin mutaţii care afectează sinteza catenelor β la nivelul translaţiei. Manifestările clinice apar sub vârsta de un an, incluzând distrofie şi creşterea circumferinţei abdominale. Apar bose frontale (proeminenţe rotunde la nivelul frunţii) datorate îngroşării oaselor craniene, paloare, proeminenţa maxilarului superior. Acestea apar în urma expansiunii măduvei osoase hematogene din cauza eritropoiezei ineficiente cu producerea tetramerilor de lanţuri α foarte instabile. Splina, ficatul şi cordul pot fi mărite datorită hematopoiezei extramedulare.

La pacienţii afectaţi apare anemie severă (Hb între 3-6,5 g/dl), pe frotiu se poate observa anizocitoză (hematii cu mărimi diferite) cu numeroase microcite, celule în ţintă, policromazie (apariţia unor hematii tinere - policromatofile - în sângele periferic, cu diametru mai mare decât hematiile normale, colorate albastru-violaceu), ocazional sferocite (hematii mici, intens colorate, fără paloare centrală), schizocite (fragmente neregulate de eritrocite) sau hematii nucleate (forme imature). Hematiile afectate prezintă o fragilitate osmotică ridicată. Bilirubinemia este uşor ridicată, urina conţine cantităţi crescute de urobilinogen şi urobilină, are culoare maronie închisă. Pe electroforeză forma dominantă este Hb F, vârful Hb A este absent, iar fracţiunea Hb A_2 este reprezentat variabil. Terapia constă din transfuzii repetate alături de chelatori de fier (cu scopul întârzierii apariţia hemosiderozei), deseori se recurge la splenectomie. Pubertatea apare tardiv, incomplet sau poate fi chiar absentă la unii pacienţi.

β-Talasemia intermediară (β^+-talasemia) apare în cazul reducerii semnificative a producerii lanţurilor β-globinice cu scăderea consecutivă a cantităţii Hb A. Manifestările clinice pot fi de severitate diferită. Terapia cu hidroxiuree este des utilizată cu scopul creşterii producerii de Hb F. Pe cromatogramele efectuate cu HPLC se observă un vârf mare de Hb F şi unul mic de Hb A. Concentraţia hemoglobinei este redusă (6-10 g/dl), caracteristicile hematiilor pe frotiul periferic sunt cele descrise la β^0-talasemie.

β-Talasemia minoră este adesea asimptomatică, cu excepţia perioadelor de stres hematopoietic cum ar fi sarcina sau infecţiile. Frotiul periferic arată microcitoză, ocazional hipocromie, poikilocitoză (hematii cu modificări de formă) sau celule în ţintă.

δβ -Talasemia are prevalenţă mare în bazinul Mării Mediterane, în special în Italia şi Grecia. Apare în urma deleţiei genelor lanţurilor δ şi β, se caracterizează printr-o cantitate redusă de Hb A_2 şi creşterea concentraţiei de Hb F.

Persistenţa ereditară de hemoglobină fetală este asimptomatică clinic, se caracterizează prin creşterea concentraţiei Hb F datorită sintezei reduse de catene β şi intensificarea compensatorie a sintezei catenelor δ. Hb F poate fi chiar 35% din Hb totală.

Sunt peste 900 de ***hemoglobinopatii*** descrise până în prezent, dintre care doar 9 au semnificaţie clinică. Migrarea populaţională din regiunile cu frecvenţă ridicată a hemoglobinopatiilor (Asia de Sud-Est şi Africa) către regiunile cu incidenţă mică a acestora (Vestul şi centrul Europei, America) au crescut numărul de cazuri înregistrate în aceste zone. Unele variante de hemoglobină interferează cu metodele HPLC care cuantifică Hb A1c.

Din punct de vedere genetic, hemoglobinopatiile pot fi cauzate de diverse tipuri de mutaţii. Există o bază de date accesibilă pe internet (pe web site-ul http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html) unde se pot găsi mutaţiile corespunzătoare diferitelor hemoglobinopatii.

Hemoglobinopatia S a fost descrisă anterior. Există şi forme hibride, cum ar fi boala caracterizată prin **Hb SC**, unde catenele β suferă substituţie în poziţia 6 fie cu valină (Hb S), fie cu lizină (Hb C). De asemenea, au fost descrise cazuri de **Hb SD**, cu manifestări clinice similare, dar mai blânde comparativ cu homozigoţii de siclemie.

Homozigoţii de Hb C, Hb D şi **E** prezintă de regulă anemie uşoară sau moderată, în timp ce heterozigoţii sunt asimptomatici.

La pacienţii cu **Hb Lepore** lanţurile α sunt normale, iar cele non-α sunt hibride având structură asemănătoare cu catenele δ în porţiunea N terminală şi cu lanţurile β la capătul C terminal, ca rezultat al unui crossing over dintre genele acestora. Există 3 forme distincte de Hb Lepore: Hollandia, Baltimore şi Boston-Washington. Pe HPLC găsim o falsă creştere a Hb A_2 (peste 10% din Hb totală), datorită faptului că se co-eluează cu Hb Lepore. Pe electroforeză alcalină se observă o bandă în poziţie S (Hb Lepore-Baltimore-Washington) sau între S şi A, iar la electroforeză acidă apare o bandă în poziţie A la toate cele trei forme. Efectuând hemograma, la homozigoţi se observă scăderea concentraţiei hemoglobinei, MCV şi MCH, manifestările clinice fiind similare cu cele descrise la β-talasemie majoră sau intermediară. La heterozigoţi modificările hematologice sunt uşoare, manifestarea bolii seamănă cu β-talasemia minoră.

5.2 Metabolismul fierului

În condiţii normale în majoritatea celulelor din organism şi în lichidele extracelulare sunt prezente cantităţi foarte mici de fier. Acest element este bine conservat, zilnic se pierde mai puţin de 0,1% din cantitatea totală de fier din organism, în special prin celulele descuamate.

5.2.1 Distribuţia fierului în organism

Fierul este prezent în organism în numeroase compartimente printre care se numără cromoproteinele, fierul de stocaj, fierul tisular, existând o dinamică permanentă între acestea.

5.2.1.1 Fierul din hemoglobină şi mioglobină

Fiecare mililitru de eritrocite conţine 1 mg de fier, astfel un adult de 70 de kg (care are aproximativ 2 litri de masă eritrocitară) conţine 2 g de fier în componenţa hemoglobinei. Mioglobina seamănă foarte mult cu o subunitate de hemoglobină.

5.2.1.2 Depozitele de fier

Fierul este stocat în organism sub formă de feritină şi hemosiderină. Feritina constă dintr-un nucleu de fier (FeOOH – oxihidroxid feric) cu înveliş proteic (apoferitină), iar hemosiderina se formează în urma înglobării feritinei în lizozomi, acesta constituind punctul final de stocaj intracelular al fierului. Eliberarea fierului din feritină include o etapă de reducere în urma căreia fierul feric (Fe^{3+}) din forma stocată se transformă în fier feros (Fe^{2+}) care difuzează în exteriorul celulei.

Feritina se găseşte aproape în toate celulele organismului. Mai ales în hepatocite şi în macrofagele măduvei osoase, dar şi în alte organe, feritina asigură o rezervă de fier disponibilă oricând pentru formarea Hb sau a altor hem-proteine, într-o formă în care fierul este separat de lichidele organismului, neprovocând distrugeri oxidative, ceea ce s-ar produce dacă el ar fi sub formă ionică. La un adult sănătos de sex masculin cantitatea totală de fier depozitat este de aproximativ 800 mg.

Cantităţi foarte mici de feritină se găsesc şi în ser, în concentraţii proporţionale cu depozitele de fier, astfel dozarea feritinei serice este un parametru biochimic fidel, larg utilizat pentru evaluarea stocurilor de fier din organism.

Hemosiderina este feritină agregată, parţial deproteinizată, insolubilă în soluţii apoase, spre deosebire de feritina solubilă. Fierul este eliberat lent din agregatele de hemosiderină, probabil datorită raportului mic dintre suprafaţă şi volum. Hemosiderina predomină, asemănător feritinei, în celulele hepatice, ale splinei şi măduvei osoase.

Evaluarea hematologică a rezervelor de fier din organism se efectuează prin examinarea microscopică a măduvei osoase (se aleg frotiuri conţinând grunji striviţi), cu ajutorul metodei de colorare Perls (fixare în vapori de formol, colorare cu ferocianură de potasiu acidă şi safranină). Această metodă evidenţiază hemosiderina medulară colorată în albastru sub formă de granule mici în eritroblaşti (sideroblaşti) şi eritrocite (siderocite), respectiv sub formă de granule mari sau sub formă difuză în macrofage (MF).

Sideroblaştii variază între 10-60%. Hemosiderina din macrofage se exprimă semicantitativ faţă de normal (absentă, cantitate normală sau crescută). Această metodă este foarte sensibilă pentru identificarea rezervelor de fier din măduva osoasă şi permite diferenţierea anemiei feriprive faţă de celelalte tipuri de anemii hipocrome, apărute prin blocarea sintezei hemului, ducând la creşterea fierului neheminic (*Tabel 5. II*).

5.2.1.3 Fierul tisular

Numeroase enzime şi coenzime din cadrul celulelor necesită fier, ca şi parte integrantă a moleculei, ori drept cofactor. Exemple notabile ar fi peroxidazele şi citocromii, ambele fiind hem-proteine. Compartimenul tisular al fierului conţine numai cca. 8 mg de fier, dar are importanţă metabolică critică. Unele activităţi enzimatice diminuează precoce în cursul deficitului de fier.

Tabelul 5.II. Criterii de diferenţiere a diverselor tipuri de anemii hipocrome cu ajutorul aspectului hemosiderinei medulare

Tip de anemie	Grad hipocromie	Sideremia	Sideroblaşti	Hemosiderina în MF
Anemie feriprivă	marcată	scăzută	<10%, sau absenţi	absentă
Anemie din infecţii, neoplazii	moderată	scăzută	scăzuţi sau absenţi	crescută
Talasemii	marcată	crescută	crescuţi	crescută
Anemie din saturnism	moderată	crescută	crescuţi	crescută
Anemii sideroblastice	marcată	crescută	inelari, crescuţi	foarte crescută

5.2.1.4 Rezerva labilă

Constă dintr-o cantitate de aproximativ 80 mg de fier, nu are o delimitare anatomică exactă, poate fi cuantificată cu ajutorul fierului marcat radioactiv prin determinări cinetice.

5.2.2 Transportul fierului

Fierul este transportat în plasmă legat de transferină, o β_1-globulină cu două locuri de legare a fierului. Complexul format dintre Fe^{3+} şi apotransferină se numeşte transferină. În urma legării transferinei la receptorul său specific de pe suprafaţa celulelor, complexul transferină-receptor se internalizează într-o vacuolă care va fi acidifiată, eliberând astfel fierul de pe transferină, iar apoproteina se reciclează.

5.2.3 Reglarea homeostaziei fierului

Reglarea cantităţii de fier din organism depinde aproape integral de modularea absorbţiei sale la nivelul intestinului subţire.

Din cantitatea de 10-15 mg de fier ingerat zilnic prin dietă, se absoarbe doar aproximativ 1 mg la nivelul duodenului, sub formă anorganică de fier feros (Fe^{2+}) sau sub formă de hem ca atare. Cantităţi mari de fier uşor de asimilat găsim în special în alimentele de origine animală: ficatul, carnea (conţine Mb), gălbenuşul de ou, cantităţi mai mici găsim în varză, spanac, etc. Numeroase proteine iau parte la reglarea homeostaziei fierului: transferina, feroportina, ceruloplasmina, β_2-microglobulina etc. La nivelul intestinului subţire, există o blocadă a mucoasei, care nu permite absorbţia unor cantităţi prea mari de fier, proteina din peretele celular saturându-se cu fier. La pacienţii cu anemii feriprive absorbţia fierului este de obicei crescută pentru a completa nevoile ridicate ale organismului.

5.2.4 Metode analitice

În laboratoarele clinice se poate determina concentraţia serică a fierului, capacitatea de legare a fierului, saturaţia transferinei, nivelul feritinei serice şi dozarea receptorilor solubili ai transferinei.

5.2.4.1 Dozarea fierului seric (sideremie)

În majoritatea metodelor standardizate principiul dozării constă din următoarele etape: eliberarea fierului din legătura sa cu transferina prin scăderea pH-ului serului, urmat de reducerea fierului feric (Fe^{3+}) la cel feros (Fe^{2+}) şi complexarea sa cu un cromogen de tipul orto- sau bathofenantrolinei, ferozinei sau α,α'-dipiridilului, cu absorbanţă ridicată la o lungime de undă corespunzătoare, proporţională cu concentraţia fierului.

Metodele se pot efectua manual sau într-o manieră automatizată, cele care includ etape de deproteinizare ne dau de regulă rezultate mai ridicate faţă de cele care nu conţin această etapă, aşadar valorile de referinţă trebuie stabilite de fiecare laborator în parte. În general, se consideră fiziologice sideremii între 90-160 µg/dL la bărbaţi şi între 80-130 µg/dL la femei, adică 14-28 µmol/L respectiv 13-27 µmol/L.

5.2.4.2 Capacitatea totală de legare a fierului (TIBC = total iron binding capacity)

Se determină prin adăugarea unei cantităţi suficiente de Fe^{3+} ca să se satureze locurile de legare a fierului de pe transferină. Excesul de fier este înlăturat, după care se determină din nou concentraţia fierului. Cu ajutorul acestor date obţinute se poate calcula saturaţia transferinei utilizând formula de mai jos:

$$\text{Saturaţia transferinei (\%)} = \\ = (100 \times \text{sideremie})/\text{TIBC}$$

Valorile normale ale saturaţiei transferinei se situează între 20-60%.

Tabelul 5.III. Intervalele de referinţă pentru valorile feritinei serice în funcţie de vârstă şi sex

Categorie de pacient	Valoare normală (µg/L)
Nou născut	25-200
Sugar de 1 lună	200-600
Sugar de 2-5luni	50-200
Copil 6 luni-15 ani	7-140
Bărbat adult	20-250
Femeie adultă	20-200

5.2.4.3 Dozarea feritinei

Se poate realiza prin diverse metode moderne, incluzând cele imunoradiometrice, ELISA, imunochemiluminiscenţă sau dozări imunofluorometrice. Valorile de referinţă diferă în funcţie de metoda utilizată, astfel fiecare laborator trebuie să-şi stabilească intervalul fiziologic. În general se consideră normale valorile prezentate în cadrul *Tabelului 5.III.*

5.2.5 Semnificaţia valorilor patologice de laborator

Nivelul ***sideremiei*** este scăzut la majoritatea pacienţilor cu anemii feriprive şi la cei care prezintă boli inflamatorii acute sau cronice, imunizări, infarct miocardic acut, boli maligne. La cei cu anemie feriprivă se observă creşterea compensatorie a nivelului transferinei, în schimb în bolile inflamatorii din cadrul unor infecţii acute şi cronice macrofagele înglobează fierul împreună cu apotransferina, ducând astfel la scăderea nivelului acestei proteine. Internalizarea fierului în macrofage are scopul de a limita accesul microorganismelor la acest element, necesar pentru multiplicarea lor. Din acest considerent, nu se recomandă administrarea tratamentului cu preparate de fier în prezenţa unor infecţii intercurente.

Valori scăzute ale fierului seric putem găsi şi la pacienţii suferind de alte forme de anemie în primele zile de tratament, de exemplu la cei cu anemie pernicioasă sub tartament cu ciancobalamină, explicaţia fiind consumul crescut de fier în urma hematopoiezei accelerate (în aceste circumstanţe se poate observa pe frotiul perferic criza reticulocitară, adică apariţia în cantităţi mari a formelor eritrocitare tinere în sânge). Nivelul sideremiei scade în urma pierderilor de sânge, prin hemoragii de diverse cauze. La bărbaţi majoritatea hemoragiilor sunt de origine digestivă, iar la femei de origine genitală.

Valori ridicate ale sideremiei întâlnim în anemiile aplastice, sideroacrestice (sidero = fier, acro = vârf, în limba greacă), în care există un deficit de utilizare a fierului în urma unor tulburări genetice care afectează sinteza hemului. Sideremii ridicate apar în cazul intoxicării cu fier pe cale orală sau parenterală şi în hepatite acute. Consecinţa supraîncărcării organismului cu fier este apariţia hemosiderozei şi hemocromatozei (diabet de bronz), cu afectarea ficatului (ciroză hepatică) şi a pancreasului din cauza depozitelor excesive de fier.

În mod normal doar o treime din locurile de legare al fierului de pe apotransferină sunt ocupate cu Fe^{3+}, aşadar transferina are o capacitate de rezervă considerabilă de legare a fierului. TIBC este măsura concentraţiei maxime de fier care poate fi legată de transferină. TIBC este adesea crescută în deficit de fier şi scăzută în boli maligne sau boli inflamatorii cronice, respectiv în hemocromatoze.

Feritina este prezentă în ser în cantităţi infime. Deşi face parte dintre proteinele de fază acută, ea reflectă de regulă în linii mari conţinutul în fier al organismului. Nivelul feritinei plasmatice scade foarte precoce în cazul unui deficit de fier, mult mai repede comparativ cu scăderea hemoglobinei, micşorarea hematiilor sau scăderea sideremiei.

O serie de boli cronice se caracterizează prin creşterea nivelului feritinei, cum ar fi infecţiile şi inflamaţiile cronice (de ex., poliartrita reumatoidă), bolile renale sau ale cordului, tumorile maligne (în special limfoame, leucemii, cancer de sân, neuroblastom). Valori crescute ale feritinei întâlnim de asemenea în hepatite virale sau după leziuni toxice ale ficatului, în urma eliberării de feritină din celulele hepatice lezate. Asocierea deficitului de fier cu una dintre aceste condiţii patologice poate duce la o valoare normală a feritinei la pacientul respectiv, ceea ce îngreunează diagnosticul. Valori crescute ale feritinei plasmatice se pot observa şi în cadrul bolilor de stocaj al fierului, totuşi dozarea acesteia nu se recomandă ca şi test screening pentru identificarea stadiilor precoce de hemocromatoză, fiind o analiză mai puţin sensibilă decât sideremia, TIBC sau determinarea procentajului de saturaţie a transferinei.

Determinarea **receptorilor solubili de transferină** este o analiză modernă care ne dă informaţii despre componenta funcţională a homeostaziei fierului, ea creşte în carenţa de fier şi scade în caz de supraîncărcare. Poate oferi un ajutor în diferenţie-

rea anemiei feriprive de anemia din bolile cronice, în special dacă se evaluează sub forma unui index luând în considerare şi concentraţia feritinei.

5.2.6 Informaţii practice, comentarii

Cu excepţia utilizării spectroscopiei de absorbţie atomică, hemoliza discretă nu influenţează dozarea sideremiei, datorită faptului că fierul nu iese din hemoglobină în urma tratamentului acid. Totuşi, probele care prezintă hemoliză masivă trebuie refuzate, fiindcă la acestea o cantitate mică de fier s-ar putea elibera din Hb.

La recoltarea probelor se va evita contaminarea cu fier a seringilor sau eprubetelor pentru a evita obţinerea unor valori fals crescute ale sideremiei. Nivelul sideremiei, TIBC şi saturaţia transferinei sunt influenţate de diverşi factori. Există variaţii diurne, dimineaţa obţinem valori normale, apoi observându-se scăderea valorilor pe parcursul zilei; la femei se constată nivele uşor crescute ale sideremiei în perioada premenstruală, iar în timpul menstruaţiei apar valori puţin mai scăzute; contraceptivele orale (în urma conţinutului de progesteron) provoacă uneori creşteri marcate ale parametrilor enumeraţi. În cursul sarcinii sideremia poate fi elevată datorită progesteronului, sau din contră poate fi scăzută ca urmare a deficitului de fier.

Din cauza scăderii preciziei de dozare a feritinei la valori foarte ridicate, probele la care s-au măsurat valori de peste 800 µg/L se vor dilua până se obţin valori în intervalul 200-400 µg/L.

5.2.7 Considerente clinice

Deficitul de fier este una dintre tulburările cu prevalenţa cea mai mare din patologia umană. Este des întâlnit la copii, femei tinere şi persoane în vârstă, dar poate apare la orice vârstă şi în cadrul persoanelor din orice statut social. La copii boala este cauzată de regulă de un deficit în dietă, deoarece laptele conţine puţin fier. La adulţi, cauza este aproape fără excepţii pierderea cronică de sânge sau nevoile crescute de fier din contextul sarcinii. La femeile gravide, din cauza necesarului crescut de fier, se recomandă suplimentarea acestui element, în special în ultimele două trimestre ale sarcinii. La sugari până la vârsta de 6 luni alimentaţia naturală previne apariţia anemiei feriprive, datorită prezenţei lactoferinei, o proteină specifică laptelui de femeie (absentă de exemplu în laptele de vacă), care are capacitate de legare a fierului. După vârsta de 6 luni toţi sugarii, inclusiv cei alăptaţi, trebuie să primească alimente cu conţinut ridicat de fier, cum ar fi gălbenuşul de ou sau ficatul.

Absorbţia fierului este mai bună dacă se asociază cu agenţi reducători (de exemplu vitamina C), care transformă fierul feric (Fe^{3+}) în fier feros (Fe^{2+}). Tratamentul cu fier nu se va opri în momentul vindecării anemiei, ci se va continua până la refacerea rezervelor de fier pentru a evita reapariţia anemiei feriprive.

Hemosideroza este termenul utilizat pentru supraîncărcarea organismului cu fier fără leziuni tisulare asociate. Apare local în zonele de sângerare sau de inflamaţie, sau poate fi extinsă la persoanele care au primit cantităţi masive de fier sub formă medicamentoasă sau în urma unor transfuzii repetate de sânge.

Hemocromatoza reprezintă o condiţie patologică în care organismul acumulează cantităţi excesive de fier, face parte dintre bolile genetice cele mai comune. Simptomele hemocromatozei includ triada clasică de bronzare tegumentară, ciroză şi diabet zaharat. Manifestările bolii pot include cardiomiopatii şi aritmii, tulburări endocrine şi artropatii.

Hemocromatoza ereditară rezultă în urma unor modificări ale proteinelor care au rol important în reglarea homeostaziei fierului. Forma care apare la adulţi a fost supranumită *hemocromatoză primară sau idiopatică*, este o boală legată de locusurile HLA aflate pe cromozomul 6. O formă mai severă, cu debut precoce este *hemocromatoza juvenilă*, există şi tipuri de hemocromatoză în care depozitele excesive de fier apar predominant în macrofage, nu în parenchimul hepatic, cum ar fi varianta legată de *deficitul de feroportină.*

Hemocromatoza ereditară (idiopatică) este forma clasică de supraîncărcare cu fier. Se datorează unei tulburări înnăscute de absorbţie a fierului, dar mecanismul patogenetic exact nu se cunoaşte. Mutaţia genei HFE este un polimorfism des întâlnit în cadrul populaţiei din Europa de Nord (10-15% sunt heterozigoţi, iar homozigoţii apar cu frecvenţa de 5/1000). Mutaţia este asociată cu receptorul de transferină, dar mecanismul prin care acesta cauzează absorbţia crescută a fierului este necunoscut. Peste jumătate dintre homozigoţi prezintă valori crescute ale saturaţiei transferinei şi/sau a feritinei, dar hemocromatoza severă, conform studiilor recente, se manifestă doar la un număr mic de subiecţi afectaţi de această mutaţie, majoritatea homozigoţilor fiind asimptomatici.

Hemocromatoza juvenilă este o afecțiune congenitală rară, care seamănă clinic cu hemocromatoza ereditară, dar debutează mult mai precoce şi persoanele afectate au o tendință mai mare de a dezvolta tulburări endocrine şi cardiace comparativ cu cei suferind de forma adultă descrisă anterior. Mutația nu este la nivelul genei HFE, dar locul exact al alterării genetice nu este încă identificat (se bănuieşte că ar fi pe cromozomul 1).

Hemocromatoze secundare apar în urma administrării masive sau absorbției crescute de fier. Pacienții suferind de unele forme de anemii care necesită transfuzii sanguine repetate pot dezvolta hemocromatoză, de asemenea şi cei care primesc din cauza unei anemii tratamente cu fier dar fără să aibă deficit de fier. Cele mai des întâlnite cauze ale hemocromatozei secundare sunt talasemia majoră şi stările de mielodisplazie, dar pot apare şi în contextul unui deficit de piruvat-kinază sau în cadrul unor anemii diseritropoietice congenitale.

5.2.8 Anemii cu stocare excesivă de fier

Cea mai comună cauză de supraîncărcare cu fier este talasemia, în special în zonele unde această boală are prevalență mare. Complicațiile cardiace în urma supraîncărcării cu fier sunt cele mai frecvente cauze de deces în β-talasemia majoră.

Anemiile sideroblastice reprezintă un grup de tulburări cu supraîncărcare de fier, majoritatea lor neavând cauza descifrată. În forma ereditară a acestei tulburări există un deficit al sintetazei acidului 5-aminolevulinic în precursorii eritrocitari din cauza unor mutații care afectează genele implicate în sinteza acestei enzime. Stocarea excesivă de fier este des întâlnită la pacienții cu anemie diseritropoietică congenitală, şi poate apare la cei cu deficite enzimatice eritrocitare, în particular cei cu deficit de piruvat kinază.

5.3 Degradarea hemului. Ictere

Hemul provenit din diferitele hemoproteine se catabolizează printr-un mecanism unic dar cu viteze diferite în primele etape. La om şi la animale de experiența cărora li s-a administrat glicină sau acid δ-aminolevulinic marcați radioactiv s-a constatat apariția în timp a două maxime de producere a bilirubinei, principalul intermediar în degradarea hemului. Primul maxim apare la cca. trei zile şi el corespunde formării şi degradării parțiale a hemoproteinelor nehemoglobinice, în particular a citocromului P_{450} şi a catalazei. La om, al doilea maxim, care cuprinde circa 75% din radioactivitatea administrată, apare după 120 zile. Această bilirubină derivă numai din degradarea Hb ştiut fiind că durata de viață a eritrocitelor este de cca. 120 zile.

5.3.1 Etapele degradării hemului

Catabolismul hemoglobinei eritrocitare începe odată cu ruperea membranelor hematiilor îmbătrânite. Hb eliberată în plasmă este fagocitată de macrofagele sistemului reticulo-endotelial, în special ale ficatului, splinei şi ganglionilor limfatici.

Etapa următoare a catabolismului hemului are loc în ficat; deci bilirubina formată în alte țesuturi decât ficatul este transportată spre acesta. Datorită insolubilității ei, transportul prin sânge se face sub formă de complex solubil bilirubină-albumină serică, capacitatea de legare a bilirubinei neconjugate de către albumina serică este limitată. Dacă bilirubina produsă în alte țesuturi decât în ficat depăşeşte capacitatea de transport de către sânge, ea difuzează în țesuturi. Deosebit de gravă este difuzia acestei forme de bilirubină liposolubilă în țesutul nervos central, unde se poate depune în nucleii de la baza creierului provocând icter nuclear care poate fi fatal sau poate cauza grave sechele neurologice. Bilirubina neconjugată nu apare în urină, fiind legată de albumina transportoare, nu poate trece filtrul renal.

Bilirubina este extrasă din sânge de către ficat, pătrunderea în hepatocite a bilirubinei se face în formă liberă, albumina transportoare rămânând în plasmă.

În vederea excreției biliare a bilirubinei, ea este trecută din nou într-o formă solubilă; de această dată are loc esterificarea unuia sau ambelor resturi propionil cu acidul glucuronic. Introducerea radicalilor glucuronil se face prin reacția bilirubinei cu UDP-glucuronatul catalizată de UDP-glucuroniltransferază, enzimă care face parte integrantă din membrana microzomială. Se obțin bilirubin-monoglucuronidul şi bilirubin-diglucuronidul care împreună se numesc bilirubina conjugată.

În ficat forma principală a bilirubinei conjugate este de monoglucuronid. În prezent se ştie că în ficat există mai multe glucuronil transferaze. Bilirubina conjugată este transportată în canaliculele biliare. Capacitatea de transport este mică în raport cu cea de conjugare, astfel încât ea constituie un mecanism limitativ cu repercursiuni asupra întregului metabolism al bilirubinei. Spre deosebire de hepatocite, în bilă cea mai mare parte a bilirubinei este sub formă de diglucuronid.

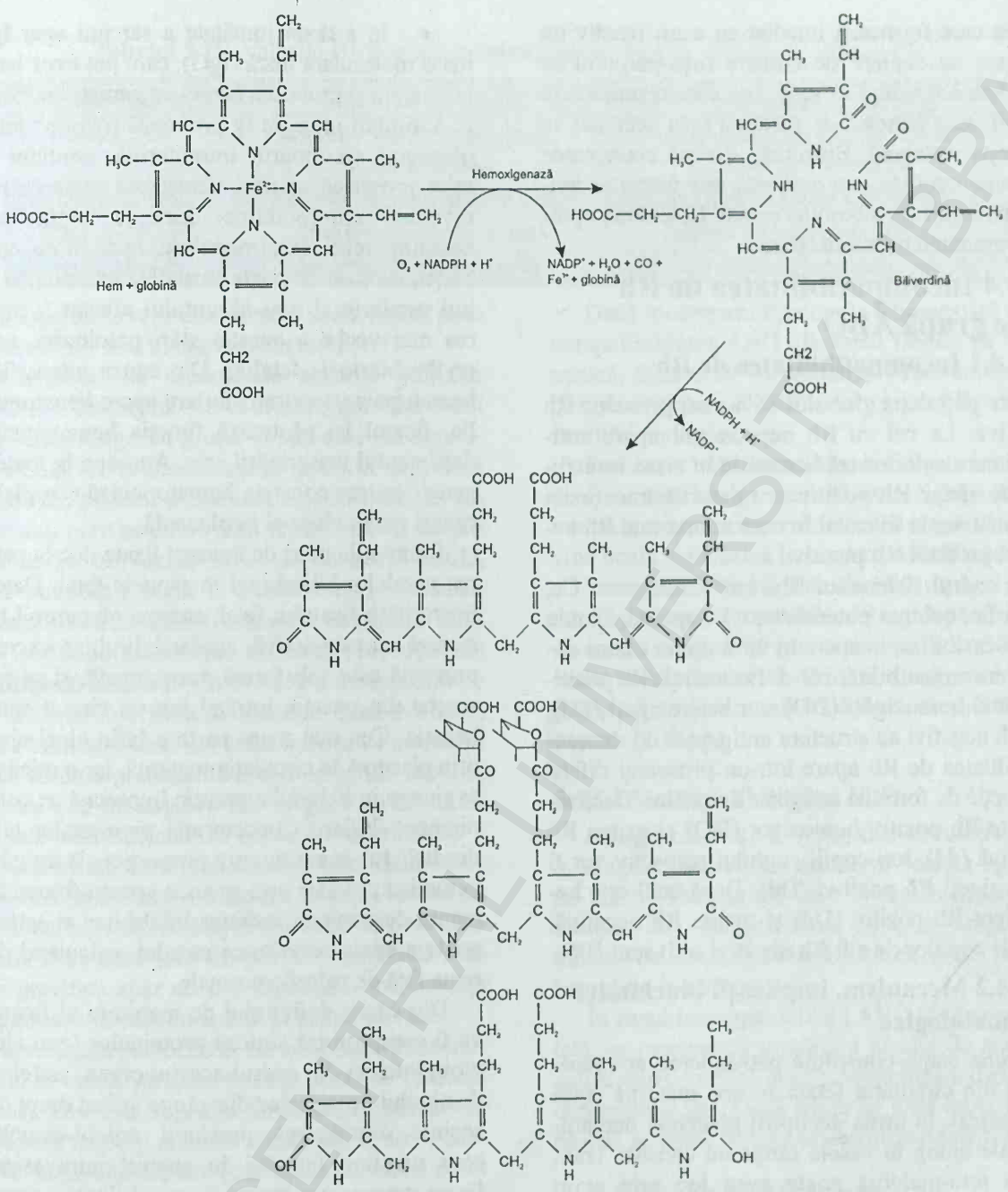


Figura 5.16. Etapele catabolismului hemului

Ultimele etape ale degradării hemului au loc în intestin unde bilirubina conjugată ajunge prin intermediul bilei. În ileonul terminal şi în intestinul gros, resturile de acid glucuronic sunt îndepărtate, bilirubina liberă este supusă unor reacţii de reducere succesive catalizate de reductaze produse de bacterii. Primul compus obţinut prin reducere care, datorită lipsei conjugării, nu are culoare, este urobilinogenul (UBG).

Cea mai mare parte a urobilinogenului este reabsorbit din intestin; ajuns prin circulaţia portală la ficat este reexcretat prin bilă. O mică parte din urobilinogenul reabsorbit se elimină pe cale renală. Urobilinogenul se transformă în stercobilinogen, apoi în stercobilină, care dă culoarea fecalelor. Aceşti compuşi împreună cu bilirubina se numesc *pigmenţi biliari.*

Din punct de vedere clinic este deosebit de important raportul bilirubină neconjugată / bilirubină conjugată din plasmă (30/1). Concentraţia celor două forme se stabileşte pe baza reacţiei cu acidul diazobenzensulfonic (reacţia Van den Berg); frac-

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ţiunea care formează imediat cu acest reactiv un compus de cuplare de culoare roşu-purpuriu se numeşte *bilirubină directă*, cea care reacţionează numai după adaosul de metanol (sau acetonă) se numeşte *indirectă*. Bilirubina directă corespunde formei conjugate, cea indirectă este forma neconjugată, legată de albumina serică. Cele două tipuri dau împreună bilirubina totală.

5.4 Incompatibilitatea de Rh şi de grupă ABO

5.4.1 Incompatibilitatea de Rh

Din populaţia globului 85% sunt persoane Rh pozitive. La cei cu Rh negativ pot apare anticorpi care aglutinează hematiile în urma transfuziei de sânge Rh pozitiv sau datorită transfuziei feto-maternale în cazul în care mama este Rh negativă iar fătul Rh pozitiv.

În cadrul sistemului Rh, sunt 6 antigene: Cc, Dd şi Ee, cel mai puternic este D, apoi C, E, c, e şi d. Sensibilizarea apare în 95% dintre cazuri datorită incompatibilităţii D-d. Persoanele Rh pozitive pot fi homozigoţi (DD) sau heterozigoţi (Dd), cei Rh negativi au structura antigenică dd. Incompatibilitatea de Rh apare într-un procentaj diferit în funcţie de formula antigenică a tatălui. Dacă tatăl este Rh pozitiv homozigot (DD) şi mama Rh negativă (dd), toţi copiii cuplului respectiv vor fi heterozigoţi Rh pozitivi (Dd). Dacă tatăl este heterozigot Rh pozitiv (Dd) şi mama Rh negativă, şansele copiilor de a fi Rh negativi (dd) sunt 50%.

5.4.2 Mecanism, implicaţii biochimice şi hematologice

Prima etapă constituie pătrunderea antigenelor D din circulaţia fetală în cea maternă (faza placentară). În urma dezlipirii placentei hematiile fetale ajung în vasele sanguine uterine. Transfuzia feto-maternă poate avea loc prin avort spontan sau provocat sau chiar şi în cursul amniocentezei dacă se lezează placenta. În frotiul periferic matern se poate vizualiza prezenţa hematiilor conţinând Hb F, care se colorează diferit de eritrocitele conţinând Hb A (se utilizează coloraţia Kleihauer). La prima sarcină chiar dacă există incompatibilitatea de Rh fătul rămâne sănătos (dacă mama nu s-a sensibilizat în prealabil).

Anticorpii antiD sunt imunoglobuline (Ig) de două tipuri:

- în prima jumătate a sarcinii se formează Ig cu masă moleculară mare (IgM), care nu trec prin placentă;
- în a doua jumătate a sarcinii apar Ig cu masă moleculară mică (IgG), care pot trece bariera placentară şi provoacă hemoliza hematiilor fetale.

Cantităţi mari de Ig provoacă hydrops fetal şi placentar cu moarte intrauterină, cantităţi mai mici provoacă anemii. Creşterea consecutivă a nivelului eritropoietinei duce la intensificarea hematopoiezei extramedulare, apar mulţi eritroblaşti, ceea ce se poate vizualiza examinând frotiul periferic al nou născutului afectat (denumirea mai veche a acestei stări patologice a fost erythroblastosis fetalis). Din cauza intensificării hematopoiezei extramedulare apare hepatomegalia, ficatul îşi păstrează funcţia hematogenă în detrimentul maturizării sale. Aproape în toate organele putem constata hematopoieză ectopică, în cazuri grave chiar şi în placentă.

Cantităţile mari de hematii lizate duc la creşterea nivelului bilirubinei în sângele fetal. Datorită imaturităţii ficatului fetal, enzima glucuronil-transferază nu este activă, aşadar bilirubina excretată prin bilă este sub formă neconjugată, şi se reabsoarbe din intestin intrând într-un circuit enterohepatic. Cea mai mare parte a bilirubinei ajunge prin placentă în circulaţia maternă, iar o mică parte ajunge în lichidul amniotic împreună cu ceilalţi pigmenţi biliari. Concentraţia pigmenţilor biliari din lichidul amniotic este proporţională cu gradul hemolizei, aşadar prin metode spectrofotometrice putem determina cantitatea bilirubinei şi astfel se poate aprecia severitatea cazului, calculând diferenţa faţă de valorile normale.

Din cauza deficitului de maturare al ficatului va fi compromisă sinteza proteinelor (mai ales a globulinelor) din cadrul acestui organ, astfel scade nivelul proteinelor din sânge având drept consecinţă diminuarea presiunii coloid-osmotice, care menţine lichidul în spaţiul intravascular. Drept urmare va creşte permeabilitatea vaselor cu formare de edeme: în cazuri mai uşoare edemele apar la nivelul membrelor inferioare, al organelor genitale, iar în cazuri mai grave toate organele vor fi afectate, vor fi acumulări de lichide şi în cavităţi (ascită în abdomen şi hydrotorax în cavitatea pleurală).

5.4.3 Implicaţii biomedicale

Simptomatologic, se vor observa abdomenul şi toracele proeminent, edemul subcutanat, edemul facial, membrele lucioase, pielea tensionată. Placenta va fi friabilă, palidă, groasă. În condiţii normale raportul de masă placentă/făt este 1/7;

Tabelul 5.IV. Valorile Hb fetale şi conduita terapeutică în incompatibilitatea Rh

Valorile Hb fetale	Gradul de severitate	Conduita terapeutică
Sub 8 g/dL	Afectare severă, iminenţă de deces al fătului	Iniţierea naşterii sau efectuarea transfuziei intrauterine
Între 8-11 g/dL	Afectare de severitate moderată	Iniţierea naşterii între săptămâna 35-37
Între 11-14 g/dL	Afectare de severitate mică	Naştere între săptămâna 37-39
Peste 14 g/dL	Nu este pericol pentru făt	Naştere la termen

în funcţie de severitatea cazului acest raport poate deveni 1/5 sau în caz extrem chiar 1/1.

Prevenţie: Se recomandă testarea grupelor ABO şi a factorului Rh la fiecare gravidă. Dacă mama are sânge de grupa O sau este Rh negativă, atunci se recoltează sânge şi de la tată; dacă el este Rh pozitiv, avem incompatibilitate de Rh între soţi care poate să aibă repercursiuni asupra fătului. Se urmăreşte titrul de anticorpi antiD, dacă anticorpii arată o creştere sau o scădere bruscă, poate însemna iminenţa decesului fătului. Leziunile hemolitice rar sunt proporţionale cu titrul de anticorpi. În literatura de specialitate s-a descris aşa numita „reacţie anamnestică", adică în timpul unei noi sarcini titrul de anticorpi de la sarcina precedentă creşte în ciuda faptului că fătul este Rh negativ. Investigaţia de laborator cea mai utilă este analiza lichidului amniotic.

Anamneză: Este important de ştiut dacă dintr-o sarcină precedentă s-a născut un copil afectat de incompatibilitatea de Rh, fiindcă la o sarcină ulterioară, dacă fătul este Rh pozitiv, leziuni de aceeaşi gravitate apar cu 2-3 săptămâni înainte faţă de perioada în care au apărut la prima sarcină.

Investigaţii paraclinice: La examenul ultrasonografic se vede hydropsul fetal şi placentar (edemul extins): fătul este în poziţia Buddha (membrele vor fi departe de corp datorită edemelor), apare o „aureolă" la nivelul capului (din cauza edemului pielii capului pielea se distanţează de craniu). Placenta edematiată este groasă (peste 5-6 cm), se constată excesul lichidului amniotic (polyhydramnios) şi diametrul abdominal va depăşi cu mult pe cel parietal (normal raportul lor este 1:1).

În urina şi sângele mamei creşte nivelul hCG (hormon coriogonadotrop uman) datorită creşterii masei placentare.

Concentraţia hemoglobinei (Hb) din sângele cordonului ombilical arată cel mai bine severitatea afecţiunii hemolitice, dar prelevarea probei necesită o tehnică specială de recoltare. *Tabelul 5.IV* arată protocolul de conduită în funcţie de valorile Hb fetale.

Dacă incompatibilitatea de Rh coexistă cu incompatibilitatea ABO afectarea fătului va fi mai uşoară, fiindcă se vor sintetiza simultan două tipuri de anticorpi, astfel anticorpii antiD vor fi în cantităţi mai mici.

Profilaxia bolii hemolitice la făt: administrarea de Ig G antiD în primele 72 de ore după naştere inhibă izoimunizarea mamelor Rh negative şi previne boala hemolitică la următorul făt Rh pozitiv.

Doza administrată este de 200 µg IgG antiD după naştere incompatibilă, 50 µg după avort dacă acesta s-a produs (sau a fost provocat) în primele 12 săptămâni de sarcină, dacă sarcina depăşeşte 3 luni se recomandă doza obişnuită după naştere (200 µg).

5.4.3.1 Incompatibilitatea ABO

Antigenele A şi B ajung din circulaţia fetală în sângele mamei, iar mama va secreta aglutinine antiA şi/sau antiB care ajung în organismul fătului, dar nu provoacă afectări importante înainte de naştere. Sensibilizarea duce la icter hemolitic la nou născut.

În cazul incompatibilităţii ABO dintre mamă şi tată, se recomandă urmărirea titrului de anticorpi antiA/antiB; vorbim despre sensibilizare dacă titrul depăşeşte 1/256. Dacă apare un icter sever la nou născut, se poate efectua exsanguino-transfuzie.

5.5 Prezentări de caz

5.5.1 Anemie feriprivă

Pacientă de 38 ani, acuză hipermenoree şi menoragie de aproximativ 6 luni, fatigabilitate, irascibilitate, palpitaţii, căderea părului, unghii friabile.

Examen obiectiv: Tegumente şi mucoase palide, piele uscată cu fisuri, ragade la comisurile labiale, koilonichie şi striaţiuni ale unghiilor.

Analize de laborator:

- Fe seric: 35 µg/dL [normal: 50-150 µg/dL]
- Hb: 10 g/dL [normal 12-16 g/dL]
- Transferina: 400 µg/dL [normal 220-370 µg/dL]

- Saturaţia transferinei: 10% [normal 20-60 %]
- Examinarea măduvei osoase: hemosiderină absentă.

Interpretare: Cea mai frecventă cauză a anemiei feriprive la femei este pierderea cronică a unor cantităţi însemnate de sânge la nivelul tractului genital. În anemiile feriprive sideremia este mică, valoarea transferinei din sânge este mare, şi saturaţia transferinei este mică. Anemia feriprivă este singura anemie în care hemosiderina medulară este absentă.

5.5.2 Litiază biliară cu obstrucţie totală a canalului coledoc

Pacient de sex feminin, 67 ani, pensionară.

Istoricul bolii: Pacienta acuză dureri colicative în hipocondrul drept cu iradiere în umărul drept apărute în urmă cu o zi, greţuri, vărsături, inapetenţă, prurit.

Examen obiectiv: Sclerotice şi tegumente icterice, durere la palparea hipocondrului drept.

Analize de laborator:

- Fosfataza alcalină: 320 U/L [normal: 30-150 U/L]
- γ-GT: 96 U/L [normal: 5-30 U/L]
- Bi directă (conjugată): 3,5 mg/dL [normal < 0,3 mg/dL]
- Bi totală: 4,1 mg/dL [normal < 1 mg/dL]
- Scaun hipocrom (decolorat)
- Analiza urinii:
  - Coloraţie: galben verzui
  - Glucoză: negativ
  - Bilirubină: 20 mg/dL
  - Corpi cetonici: negativ
  - Densitate: 1,020 g/cm^3
  - Eritrocite: negativ
  - pH: 7,0
  - Proteine: negativ
  - UBG (urobilinogen): negativ
  - Nitraţi: negativ
  - Leucocite: negativ.

Interpretare: Pacienta prezintă icter datorită creşterii concentraţiei de bilirubină care a apărut în urma obstrucţiei coledociene. Calculii biliari pot provoca obstrucţie parţială sau totală (în cazul nostru), care poate fi intermitentă, în timp ce cancerul de cap pancreatic cauzează de regulă obstrucţie totală. Enzimele fosfatază alcalină şi γ-GT (γ-glutamil-transpeptidază) sunt localizate în epiteliul canaliculelor biliare, aşadar în urma presiunii crescute cauzate de obstrucţie ele difuzează în sânge. Bilirubina directă este mult crescută, aceasta reprezentând forma conjugată, care se găseşte şi în urina pacientei, fiind un compus hidrosolubil, dând coloraţia verzuie urinii. Datorită obstrucţiei complete a căilor biliare bilirubina conjugată nu ajunge în intestin, aşadar nu are loc sinteaza urobilinogenului, compus care va dispare din urină.

5.5.3 Icter neonatal - formă gravă

Nou-născut de 2 zile, s-a născut prematur la 30 săptămâni cu masa corporală de 1700 g prin operaţie cezariană. Scor APGAR 6 la 1 minut, 7 la 5 minute. Din prima zi de naştere pacientul prezintă icter foarte accentuat.

Examen obiectiv: Tegumente şi mucoase intens icterice, agitaţie, convulsii, respiraţie paradoxală cu perioade de apnee.

Analize de laborator:

- Bi directă: 0,1 mg/dL [normal < 0,3 mg/dL]
- Bi totală: 23 mg/dL [normal < 1 mg/dL]
- GPT: 10 UI/L [normal < 13 UI/L la copii sub 5 ani]
- GOT: 36 UI/L [normal < 40 UI/L la sugari sub 3 luni]

Interpretare: Icterul neonatal la prematuri poate fi foarte precoce şi intens datorită imaturităţii ficatului. Enzima UDP-glucuronil-transferază nefiind încă activă, creşte în ser concentraţia bilirubinei neconjugate. Datorită hidrofobicităţii acestui compus, are afinitate mare pentru structurile lipidice şi se poate depune la nivelul creierului în special în nucleii bazali (caudat şi lenticular), provocând icter nuclear cu manifestări neurologice grave şi sechele de durată (retard mental, tulburări comportamentale). Pentru a preveni aceste consecinţe severe, se recomandă administrarea de fenobarbital ca inductor enzimatic (stimulează sinteza enzimei care catalizează glucuronoconjugarea) şi fototerapia (facilitează descompunerea şi eliminarea bilirubinei neconjugate din organism).

5.5.4 Porfirie intermitentă acută

Pacientă de sex feminin, 19 ani, studentă, în urma utilizării de anticoncepţionale (terapie cu debut de 4 zile) şi alcool etilic în cantităţi moderate în seara precedentă, pacienta prezintă crampe abdominale, dureri la nivelul membrelor superioare urmată de dificultăţi motorii la extremităţi, vărsături repetate.

Examen obiectiv: Tegumente şi mucoase normal colorate, sensibilitate dureroasă difuză la nivel abdominal, tahicardie, urină colorată normal după emisie, dar care se închide la culoare treptat căpătând o tentă purpurie în urma expunerii la aer.

Analize de laborator: Creşterea concentraţiei urinare de δ-ALA (acid delta-amino-levulinic) şi PBG (porfobilinogen).

Interpretare: Boala se datorează deficitului de hidroximetilbilan sintetază. Afecţiunea poate rămâne latentă până la intervenţia unor factori care accentuează calea de sinteză a hemului. În urma intensificării acestei căi metabolice se acumulează intermediarii care preced deficitul enzimatic (δ-ALA şi PBG), compuşi care se elimină prin urină şi prin oxidare conferă urinii o tentă roşiatică, iar la nivelul sistemului nervos blochează Na^+-K^+-ATP-aza. Tulburările la nivelul sistemului nervos periferic pot provoca pareze şi paralizii, perturbarea inervaţiei vegetative poate induce peristaltism necontrolat provocând vărsături. În urma asemănării structurale dintre neurotransmiţătorul inhibitor GABA (acid gama-amino-butiric) şi δ-ALA (diferă doar printr-o grupare cetonică) pot apare tulburări neuropsihice (halucinaţii, depresie, psihoze).

5.5.5 Hemocromatoză primară

Pacient de sex masculin, 45 ani, muncitor, s-a prezentat la medic din cauza unor dureri la nivelul articulaţiei genunchiului stâng apărută în urmă cu câteva zile. În urmă cu trei luni a observat colorația mai intensă a tegumentelor în special la nivelul feţei şi a gâtului şi scădere în greutate.

Examen obiectiv: Tegumente şi mucoase intens colorate (nuanţă gri-maronie cu tentă uşor icterică), eritem palmar, ginecomastie bilaterală, sensibilitate dureroasă la nivelul genunchiului stâng, hepatomegalie.

Analize de laborator:

- Fe seric: 380 µg/dL [normal: 80-160 µg/dL]
- Feritină: 465 µg/L [normal: 20-250 µg/L]
- Saturaţia transferinei: 95% [normal: 20-60 %]
- Bi directă (conjugată): 1,5 mg/dL [normal < 0,3 mg/dL]
- Bi totală: 3,8 mg/dL [normal < 1 mg/dL]
- GPT: 56 UI/L [normal: 2-20 UI/L]
- GOT: 84 UI/L [normal: 2-20 UI/L]
- Glicemie: 165 mg/dL [normal: 60-105 mg/dL].

Interpretare: În urma creşterii absorbţiei intestinale a fierului se depun cantităţi excesive de metal în diverse organe (ficat, pancreas, miocard, hipofiză, etc.). Diagnosticul se poate pune pe baza simptomatologiei (hiperpigmentarea pielii, fenomene de artrită, hepatomegalie cu icter, ginecomastie) şi a analizelor de laborator (sideremia, nivelul feritinei şi saturaţia transferinei sunt crescute, activitatea transaminazelor este moderat crescută şi bilirubinemia ridicată datorită afectării hepatice cu evoluţie spre ciroză, iar glicemia este crescută datorită diabetului zaharat secundar leziunilor pancreatice).

Bibliografie selectivă

1. Ádám Veronika, *Orvosi Biokémia: Medicina Könyvkiadó* Rt., Budapest, 2002.
2. András Ibolya, Nemes-Nagy Enikő, Fazakas Zita, sub redacţia Ştefan Hobai: *Biochimie Medicală*, Ed. Veritas, Târgu Mureş, 2005.
3. Bishop M., Fody E., Schoeff L.: *Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations*, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 2005.
4. Brittenham G.M.: *New advances in iron metabolism, iron deficiency and iron overload.* Current Opinion in Hematology, 1994, 1:101-106
5. Burtis C., Ashwood E., Bruns D.: *Tietz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Ed. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, 2006.
6. Cook J.D. et al: *Serum transferrin receptor.* Ann Rev Med, 1993, 44: 63-74
7. Dinu Veronica, Truţia Eugen, Popa-Cristea Elena, Popescu Aurora: *Biochimie Medicală – Mic tratat*, Ed. Medicală, Bucureşti, 2000.
8. Eun J.L. et al: *Soluble Transferrin Receptor (sTfR), Ferritin, and sTfR/Log Ferritin Index in Anemic Patients with Nonhematologic Malignancy and Chronic Inflammation*, Clinical Chemistry, 2002, 48: 1118-1121
9. Fazakas Zita: *Biokémia*, Ed. University Press, Târgu-Mureş, 2007.
10. Fonyó Attila: *Az orvosi élettan tankönyve*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1999.
11. Hobai Ştefan: *Curs de Biochimie*, volum I, Litografia UMF Târgu Mureş, 2006.
12. Juhász Péter, Dux László: *Klinikai laboratóriumi diagnosztika*, Springer Tudományos Kiadó, Budapest, 2000.
13. Lampé László: *Szülészet, nőgyógyászat (Obstetrică, Ginecologie)*, Ed. Medicina, Budapest, 1987
14. Mihele Denisa: *Biochimie clinică*, Editura Medicală, Bucureşti, 2001.
15. Nemes-Nagy Enikő, Fazakas Zita, Mareş-Ferencz Gizella: *Általános és alkalmazott biokémia, szülészeti és neonatológiai vonatkozásokkal*, Ed. Studium, Târgu Mureş, 2009

BCU CLUJ LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 6.
Vitaminele şi importanţa lor medicală

Elena Luminiţa Enache, Minodora Dobreanu

Vitaminele sau vitamerele, compuşi care sunt interconvertiţi la o formă funcţională comună sau care se pot substitui reciproc, sunt molecule organice care, în cantităţi mici, de ordinul microgramelor sau miligramelor, sunt indispensabile pentru funcţionarea normală a organismului. Acestea, fie nu pot fi sintetizate în organism, fie sunt produse în cantităţi insuficiente. Prin urmare, organismul este dependent de aportul alimentar al acestora. Ceea ce deosebeşte aportul vitaminic de cel al altor principii nutritive (glucide, proteine, lipide), este faptul că necesarul de vitamine este foarte redus. Aceasta se datorează faptului că vitaminele nu servesc drept suport plastic sau energetic, ci funcţionează drept grupări prostetice pentru constituenţi celulari minori cantitativ sau drept cofactori enzimatici în reacţiile biologice. La fel ca majoritatea catalizatorilor, vitaminele sunt necesare în cantităţi reduse.

Necesarul de vitamine depinde de vârstă, activitatea fizică, felul dietei etc. Necesarul este crescut la copii, la femeile gravide şi la cele care alăptează, vitaminele conţinute în raţia alimentară fiind uneori insuficiente în aceste cazuri.

Lipsa vitaminelor apare cel mai frecvent în cadrul malnutriţiei generale, dietei inadecvate, ca o complicaţie a altor boli, cum ar fi malabsorbţia şi alcoolismul, în cazul necesităţilor metabolice crescute, de exemplu în caz de hipertiroidism, febră, stress, ca o consecinţă a hemodializei sau nutriţiei parenterale totale sau ca rezultat al unor erori congenitale de metabolism.

Simptomele precoce ale stărilor de hipovitaminoză sunt în mod obişnuit, nespecifice. Diagnosticul precoce al stărilor carenţiale nu poate fi bazat pe examenul fizic, întrucât semnele clasice de deficit vitaminic (precum scorbutul), nu sunt manifeste decât după ce a fost atins un deficit sever.

Efectul unei alimentaţii deficitare în vitamine este amplificat de utilizarea îndelungată a medicamentelor care interferă cu absorbţia, utilizarea sau cu excreţia vitaminelor. Astfel de medicamente sunt diureticele şi laxativele, iar categoria populaţională interesată cel mai mult sunt vârstnicii.

Cu câteva excepţii, în care carenţa vitaminică este unică, precum deficitul de vitamină B_{12} în anemia pernicioasă, majoritatea deficitelor apărute la persoanele cu nutriţie dezechilibrată sunt plurifactoriale. Repleţia rezervelor la aceşti pacienţi se realizează de preferat prin dietă şi, dacă este necesar, pot fi administrate suplimente specifice.

Profilaxia se face printr-o alimentaţie echilibrată şi, în unele cazuri, cu suplimentarea vitaminelor cu preparate vitaminice. Pentru anumite vitamine, deficitul se manifestă în cadrul unor entităţi clinice caracteristice, care pot îmbrăca forme severe. Principalele boli datorate deficitului vitaminic, la om, sunt: beri-beri, scorbutul, pelagra, keratomalacia şi rahitismul.

BCU "Victor Babeş" UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 6.
Vitaminele şi importanţa lor medicală

Elena Luminiţa Enache, Minodora Dobreanu

Vitaminele sau vitamerele, compuşi care sunt interconvertiţi la o formă funcţională comună sau care se pot substitui reciproc, sunt molecule organice care, în cantităţi mici, de ordinul microgramelor sau miligramelor, sunt indispensabile pentru funcţionarea normală a organismului. Acestea, fie nu pot fi sintetizate în organism, fie sunt produse în cantităţi insuficiente. Prin urmare, organismul este dependent de aportul alimentar al acestora. Ceea ce deosebeşte aportul vitaminic de cel al altor principii nutritive (glucide, proteine, lipide), este faptul că necesarul de vitamine este foarte redus. Aceasta se datorează faptului că vitaminele nu servesc drept suport plastic sau energetic, ci funcţionează drept grupări prostetice pentru constituenţi celulari minori cantitativ sau drept cofactori enzimatici în reacţiile biologice. La fel ca majoritatea catalizatorilor, vitaminele sunt necesare în cantităţi reduse.

Necesarul de vitamine depinde de vârstă, activitatea fizică, felul dietei etc. Necesarul este crescut la copii, la femeile gravide şi la cele care alăptează, vitaminele conţinute în raţia alimentară fiind uneori insuficiente în aceste cazuri.

Lipsa vitaminelor apare cel mai frecvent în cadrul malnutriţiei generale, dietei inadecvate, ca o complicaţie a altor boli, cum ar fi malabsorbţia şi alcoolismul, în cazul necesităţilor metabolice crescute, de exemplu în caz de hipertiroidism, febră, stress, ca o consecinţă a hemodializei sau nutriţiei parenterale totale sau ca rezultat al unor erori congenitale de metabolism.

Simptomele precoce ale stărilor de hipovitaminoză sunt în mod obişnuit, nespecifice. Diagnosticul precoce al stărilor carenţiale nu poate fi bazat pe examenul fizic, întrucât semnele clasice de deficit vitaminic (precum scorbutul), nu sunt manifeste decât după ce a fost atins un deficit sever.

Efectul unei alimentaţii deficitare în vitamine este amplificat de utilizarea îndelungată a medicamentelor care interferă cu absorbţia, utilizarea sau cu excreţia vitaminelor. Astfel de medicamente sunt diureticele şi laxativele, iar categoria populaţională interesată cel mai mult sunt vârstnicii.

Cu câteva excepţii, în care carenţa vitaminică este unică, precum deficitul de vitamină B_{12} în anemia pernicioasă, majoritatea deficitelor apărute la persoanele cu nutriţie dezechilibrată sunt plurifactoriale. Repleţia rezervelor la aceşti pacienţi se realizează de preferat prin dietă şi, dacă este necesar, pot fi administrate suplimente specifice.

Profilaxia se face printr-o alimentaţie echilibrată şi, în unele cazuri, cu suplimentarea vitaminelor cu preparate vitaminice. Pentru anumite vitamine, deficitul se manifestă în cadrul unor entităţi clinice caracteristice, care pot îmbrăca forme severe. Principalele boli datorate deficitului vitaminic, la om, sunt: beri-beri, scorbutul, pelagra, keratomalacia şi rahitismul.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Hipervitaminozele rezultă fie prin aport alimentar excesiv, fie (mai frecvent) prin ingestie voluntară. Vitaminele sunt utilizate în doze mari pentru profilaxia unui număr mare de boli, fără legătură cu stările carenţiale specifice. Copiilor li se administrează de obicei multivitamine, în timp ce adulţii folosesc frecvent o singură vitamină. Această practică este, cel mai adesea, nefundamentată ştiinţific şi eficacitatea sa este nulă sau îndoielnică. Consumul de suplimente vitaminice are o incidenţă crescută în rândul persoanelor cu nivel crescut de educaţie, de obicei cu o stare bună de sănătate.

Este necesară o cunoaştere mai aprofundată a efectelor extraselor din plante şi ale remediilor alternative asupra metabolismului vitaminelor. Se ştie că multe medicamente prescrise afectează metabolismul vitaminelor. Multe persoane consumă o mare varietate de produse naturiste necontrolate, despre care există puţine informaţii disponibile. La aceste persoane există riscul de a dezvolta forme clinice de carenţe vitaminice.

Este necesară, de asemenea, reevaluarea atentă a conceptului de „normal" în privinţa statusului vitaminic în populaţie. Date recente sugerează că, în intervalele considerate „normale" există totuşi diverse grade de risc pentru boală. De exemplu, indivizii cu nivele de acid folic aproape de limita inferioară a normalului, au nivele semnificativ crescute de homocisteină serică. În condiţiile în care concentraţia crescută de homocisteină circulantă este privită ca un factor de risc cardiovascular, limitele „normalului" ar trebui, probabil, revizuite.

Clasificarea vitaminelor se face, pe baza solubilităţii lor, în vitamine hidrosolubile şi vitamine liposolubile.

6.1 Vitaminele hidrosolubile

Grupa aceasta cuprinde acidul ascorbic şi complexul vitaminelor B: tiamina, riboflavina, piridoxina, acidul nicotinic, acidul folic, ciancobalamina, biotina şi acidul pantotenic. Acţionează în principal în calitate de cofactori sau precursori de cofactori ai unor enzime esenţiale pentru metabolismul normal.

Vitaminele hidrosolubile se distribuie în lichidul extracelular şi sunt eliminate cu uşurinţă pe cale renală, iar depozitele din organism sunt mici. Acest fapt explică de ce stările carenţiale survin relativ repede în cazul vitaminelor hidrosolubile.

6.1.1 Complexul vitaminelor B

6.1.1.1 Vitamina B_1 şi coenzima (gruparea prostetică) tiamin pirofosfat

Este numită şi tiamină sau aneurină (lipsa ei determină polinevrita, boala *beri-beri*).

Din punct de vedere structural, molecula de vitamina B_1 este alcătuită dintr-un nucleu tiazolic substituit, un nucleu pirimidinic substituit şi o punte metilen (*Figura 6.1*).

Proprietăţi fizice: în stare solidă este incoloră, cristalină, solubilă în apă, în soluţii acide (pH<5) este stabilă, iar în soluţii bazice se descompune. Oxidarea duce la formarea unui tiocrom cu fluorescenţă albastră, folosit pentru determinarea fluorimetrică în produsele biologice.

Vitamina B_1 se găseşte în coaja şi germenii boabelor de cereale, legume, fructe, carne de porc, ficat, rinichi, lactate. Pâinea şi cerealele integrale sunt cele mai importante surse de tiamină. În procesul de obţinere a făinei albe şi a celei negre, se pierde o mare parte din tiamina prezentă în grâu. În unele ţări, precum Marea Britanie, făina este suplimentată artificial cu tiamină, pentru a obţine concentraţia de 0,24 mg/100g, prezentă în făina integrală de grâu.

Tiamina este susceptibilă la degradare în timpul preparării termice a alimentelor, în special în mediu neutru sau alcalin. Tiamina este degradată în urma tratării legumelor cu bicarbonat de sodiu, o practică des întâlnită, care serveşte la menţinerea culorii verzi intense a acestora. Tiamina este, de asemenea, inactivată prin oxidarea cu SO_2, un aditiv alimentar comun, utilizat pentru combaterea fungilor. Tiaminazele prezente în peştele crud şi în alte alimente marine şi polifenolii prezenţi în cafea şi în ceai degradează o parte din vitamina prezentă în alimentaţie.

Necesarul zilnic al unui adult este de 1,2 mg pentru bărbaţi, 1,1 mg pentru femei (plus 0,3 mg în timpul sarcinii şi alăptării) şi 0,3-1,2 mg pentru copii, dar poate creşte de trei ori în stări patologice (febră, diaree severă, stres). Necesitatea creşte în cazul unei diete cu aport excesiv de carbohidraţi, fiind recomandate 0,4-0,5 mg pentru fiecare 1000 calorii, la care se adaugă 0,6 mg/ 1000 calorii în timpul sarcinii şi lactaţiei.

Metabolismul vitaminei începe prin absorbţia din intestin prin mecanism activ, pentru doze mari adăugându-se şi un proces de difuziune. Capacitatea maximă de absorbţie este de 10-15 mg/zi,

crescând uşor în cazul administrării fracţionate, împreună cu alimentele. Absorbţia intestinală a tiaminei este puternic diminuată în prezenţa alcoolului, chiar şi în cantităţi mici.

În ficat, rinichi şi inimă are loc fosforilarea tiaminei cu ATP, sub acţiunea tiaminpirofosfokinazei, cu formarea de tiaminpirofosfat (TPP) (*Figura 6.2*). Dozele mici, corespunzătoare aportului alimentar minim, sunt metabolizate integral, în timp ce dozele mari saturează depozitele, excesul eliminându-se pe cale urinară, sub formă neschimbată.

În plasmă, vitamina este prezentă ca tiamină liberă, iar în eritrocite ca tiaminpirofosfat, formă activă (coenzimatică), nedifuzibilă. Leucocitele conţin de aproximativ 5 ori mai multă tiamină decât eritrocitele, de aceea nivelul vitaminei leucocitare reflectă mult mai bine deficienţa tiaminică.

Eliminarea vitaminei B_1 în urina de 24 de ore, în cazul unui regim mixt, oscilează între 100 şi 500μg, fiind destul de variabilă. Aceste cifre pot să crească mult în cazul unei vitaminoterapii sau alimentaţiei bogate în vitamine, sau pot scădea, dacă vitamina B_1 lipseşte din alimentaţie.

TPP-ul este coenzimă pentru enzimele care catalizează reacţiile de decarboxilare oxidativă. În mitocondrie există trei complexe enzimatice care utilizează TPP pentru producerea de energie. Piruvat dehidrogenaza transformă piruvatul, rezultat din glicoliză, în acetil-CoA, care intră apoi în ciclul Krebs. Mecanismul de acţiune *in vitro* constă în transformarea carbonului C2 în carbanion prin ionizarea H^+ legat de el în ciclul tiazolic, iar *in vivo* reacţia are loc cuplată cu un complex multienzimatic al piruvat dehidrogenazei care cuprinde acidul lipoic, coenzima A (CoA-SH), NAD^+, FAD. Alfa cetoglutarat dehidrogenaza este implicată în ciclul acizilor tricarboxilici, participând la transformarea 2-oxoglutaratului în succinil-CoA. Dehidrogenaza α-cetoacizilor cu catenă ramificată metabolizează aminoacizii cu catenă ramificată, după ce au fost transaminaţi. Dintre aceste trei enzime, piruvat dehidrogenaza leagă cel mai slab TPP, prin urmare, această enzimă este cea mai sensibilă la aportul scăzut de tiamină. Deficitul de tiamină diminuează metabolismul aerob al carbohidraţilor şi conduce la creşterea producerii de lactat prin glicoliză.

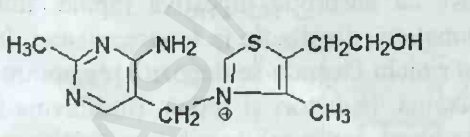


Figura 6.1. Structura tiaminei

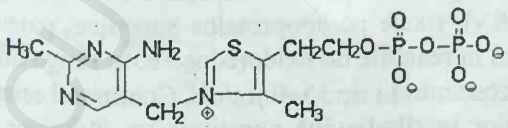


Figura 6.2. Tiamin pirofosfatul

TPP este, de asemenea, un cofactor pentru transcetolaze, fiind implicat în producerea NADPH pe calea pentozo-fosfaţilor.

Se presupune că tiamina intervine în procesul de conducere a potenţialului de acţiune la nivel axonal, fiind implicată în funcţia canalelor de sodiu şi modulează funcţia receptorului colinergic de tip nicotinic în cadrul transmisiei neuro-musculare. O cantitate mică de tiamină se găseşte în organism sub formă de trifosfat, cu rol în deschiderea canalelor de clor din membrana neuronală, în timpul conducerii impulsului nervos.

O alimentaţie echilibrată asigură cantităţile necesare zilnice de vitamina B_1. Deficitul vitaminic apare în condiţiile unui consum crescut de glucide asociat cu un aport diminuat de tiamină, sau unor necesităţi metabolice sporite: sarcină, alăptare, hipertiroidism. Persoanele care consumă băuturi alcoolice în cantităţi mici de-a lungul întregii zile prezintă riscul apariţiei deficitului de tiamină, datorită scăderii absorbţiei la nivel intestinal.De asemenea, intoxicaţia cu plumb scade nivelul tiaminei în creier.

Carenţa de vitamină B1 determină acumularea α-ceto-acetaţilor (piruvat, α-cetoglutarat), cu perturbarea metabolismului glucidic. Simptomele precoce sunt nespecifice şi includ constipaţie, scăderea apetitului, greaţă, depresie, neuropatie periferică, tahicardie şi oboseală. Întrucât sistemul nervos este dependent de producerea de ATP din carbohidraţi, principala manifestare a deficitului cronic de tiamină se manifestă prin neuropatie, cu apariţia unor simptome mai severe, printre care ataxie, confuzie, pierderea coordonării oculare.

Boala cunoscută sub numele de „beri-beri" se datorează deficitului sever de vitamină şi se manifestă clinic prin polinevrite periferice degenerative şi atrofie musculară (beri-beri uscat), edeme şi cardiomegalie (beri-beri umed). Creşterea nivelului de lactat din circulaţie afectează capilarele şi produce vasodilataţie arteriolară, fenomene responsabile pentru manifestările cardiovasculare.

O altă afecţiune este sindromul Wernicke-Korsakoff, caracterizat prin fenomene de encefalopatie, cu ataxie, scăderea memoriei, confabulaţii, nistagmus

orizontal şi vărsături. Acesta este întâlnit în special în asociere cu alcoolismul cronic, care provoacă policarenţă vitaminică B, cu predominanţa tiaminei.

Semnele biochimice ale hipovitaminozei B_1 constau în scăderea cantităţii de tiamină în urină (0-14 μg/zi), creşterea concentraţiei de piruvat şi α-cetoglutarat în sânge, micşorarea concentraţiei vitaminei în eritrocite. Trebuie avut în vedere faptul că excreţia urinară a tiaminei reflectă doar aportul recent şi poate fi crescut după administrarea diureticelor.

Creşterea concentraţiei lactatului şi piruvatului în circulaţie după administrarea unei doze test de glucoză, a fost utilizată în trecut pentru diagnosticul carenţei de tiamină.

Statusul tiaminei la un individ poate fi estimat cu mai mare acurateţe prin determinarea activităţii transcetolazei eritrocitare în prezenţa, respectiv în absenţa unei cantităţi suplimentare de TPP adăugate în mediul de reacţie. Acest test apreciază, de fapt, nivelul de saturare a apoenzimei cu coenzima sa, TPP. Dacă depozitele de tiamină sunt scăzute, adăugarea de tiamină la un lizat eritrocitar este însoţită de o creştere intensă a activităţii enzimei. O creştere cu cel puţin 20% este diagnostică pentru carenţa tiaminică. La persoanele fără deficit vitaminic, transcetolaza eritrocitară este saturată în mare parte cu TPP, iar adăugarea coenzimei la lizatul eritrocitar nu se însoţeşte de o creştere semnificativă a activităţii enzimatice. Acesta este un exemplu de test de reactivare enzimatică.

După administrarea tiaminei în doze mari (50-100 mg/zi), starea generală a pacientului se ameliorează rapid. Tulburările cardiace se remit prompt, dar leziunile nervoase cedează mai lent, uneori fiind ireversibile. Este important ca, la alcoolicii în stare gravă, care prezintă şi hipoglicemie, tratamentul vitaminic să fie început înaintea administrării glucozei, altfel pot fi precipitate fenomene acute de avitaminoză.

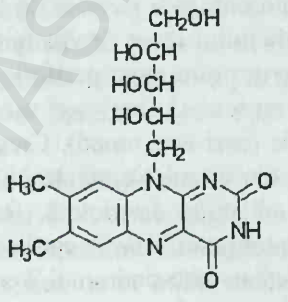


Figura 6.3. Structura riboflavinei

6.1.1.2 Vitamina B_2 şi coenzimele (grupările prostetice) flavinice

Este numită riboflavina sau ribitol, flavin fiind un pigment galben. Riboflavina este precursorul coenzimelor flavin mononucleotid (FMN) şi flavin adenin dinucleotid (FAD). Enzimele care necesită FMN sau FAD drept coenzime sunt denumite flavoproteine. Diverse flavoproteine conţin şi ioni metalici, fiind denumite metaloflavoproteine.

Structural, vitamina B_2 este formată din izoaloxazină (benzen + pirazină + dioxipirimidină) şi un rest glucidic, ribitilul, rezultat prin reducerea ribozei (*Figura 6.3*).

Proprietăţile fizice ale vitaminei B_2, importante pentru dozarea acesteia în diverse medii biologice, constau în determinarea unei fluorescenţe galben-verzui (lumicrom, respectiv lumiflavină), în soluţii cu pH de 3-9. Totodată, vitamina B_2 este solidă, de culoare galbenă, cristalină, puţin solubilă în apă şi stabilă în soluţii apoase.

Riboflavina este mult mai puţin răspândită decât celelalte vitamine din grupul B. Este prezentă în lactate, albuşul de ou, carne, legume (tomate, mazăre). Laptele este sursa cea mai importantă, urmată de carne şi, apoi de cereale.

Riboflavina este relativ stabilă termic, degradându-se în mică măsură în timpul preparării alimentelor. În schimb, este sensibilă la acţiunea luminii vizibile. Deşi lumina afectează doar suprafaţa alimentelor, acest fenomen poate fi important în cazul unui conţinut scăzut de vitamină.

Necesarul zilnic de vitamina B_2 este de 1,1 mg la femei, 1,4 mg la femeile gravide, 1,3 mg la bărbaţi şi poate creşte la femeile care alăptează la 1,6 mg/zi. De asemenea, necesarul de riboflavină este crescut la pacienţii supuşi hemodializei cronice sau dializei peritoneale.

Metabolismul vitaminei începe în tubul digestiv cu absorbţie digestivă rapidă, transport plasmatic şi distribuţie în tot organismul, în ficat şi în rinichi făcându-se depozite temporare de riboflavină. În umori şi retină, riboflavina se găseşte liberă, iar în celule sub formă de coenzimele flavin mononucleotid (riboflavin 5'-fosfat, FMN) şi flavin adenin dinucleotid (FAD) (*Figura 6.4*), fixate pe apoproteine specifice, participând în reacţiile de oxidoreducere. În sânge atinge concentraţii de 35-40μg/dL. Conţinutul eritrocitelor în riboflavină constituie un indicator al aportului alimentar. La om, eliminarea acestei

vitamine se face în majoritatea cazurilor pe cale renală. Cantitatea eliminată zilnic după o ingestie alimentară normală şi echilibrată este de 0,8-1,2 mg/ 24 h. Nou-născutul de 9-10 zile elimină o cantitate de 20-200 μg/ 24 ore. Eliminarea mai are loc şi pe cale intestinală. În materiile fecale umane întâlnim 200-600 μg de riboflavină /24 de ore.

Nu se transferă liber prin placentă, dar se pare că există o proteină transportoare a cărei sinteză este stimulată de estrogeni.

Coenzimele flavinice sunt grupări prostetice, fiind legate strâns, dar necovalent de atomii de fosfor. Mecanismul de acţiune constă în fixarea temporară la atomii de azot 1 şi 10 din ciclul izoaloxazinic a doi atomi de hidrogen de la substrate reduse (SH_2).

Deficitul vitaminic survine rareori, cantităţile necesare zilnic fiind conţinute obişnuit în raţia alimentară. Hipovitaminoza B_2 poate fi întâlnită atunci când alimentaţia este săracă, la alcoolicii cronici sau în administrarea antagoniştilor de genul galactoflavinei. Vitamina B_2 este denumită vitamina mucoaselor şi tegumentelor, întrucât carenţa de vitamina B_2 determină apariţia de stomatită angulară, cheilită, ulceraţii bucale, corneene, uretrale, sensibilitatea ochilor la lumină, dermatită seboreică şi anemie normocromă, normocitară prin hipoplazia eritrocitară în măduva osoasă. Aceste manifestări sunt reversibile după administrarea terapeutică a vitaminei. Riboflavina se descompune în urma expunerii la lumină. Această caracteristică poate conduce la deficit vitaminic la nou-născuţii trataţi prin fototerapie pentru icter neonatal. În hipovitaminoze, elimi-

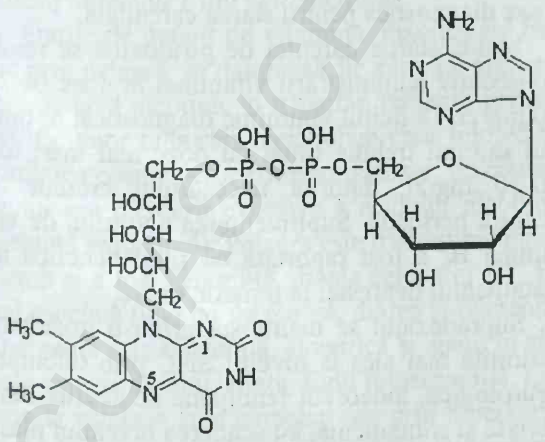


Figura 6.4. Structura FAD. In $FADH_2$, atomii de N 1 şi 5 au legat câte un atom de H.

narea urinară a riboflavinei poate scădea excesiv, atingând cifra de 70μg/24 de ore.

Hormonii tiroidieni şi steroizii suprarenalieni cresc sinteza FMN şi FAD. Fenotiazinele şi antidepresivele triciclice inhibă competitiv sinteza coenzimei flavinice, dar nu produc deficienţă fără concursul altor factori.

Riboflavina şi derivaţii săi pot fi analizaţi cu acurateţe prin cromatografie în mediu lichid de înaltă performanţă (HPLC). Determinarea nivelului excreţiei de riboflavină prin urină trebuie făcută înaintea administrării oricărui supliment. Recoltarea urinei se face în încăperi slab luminate, iar probele se păstrează şi se transportă în recipiente opace, datorită sensibilităţii vitaminei la acţiunea luminii.

Există şi un test funcţional, care determină saturaţia cu FAD a glutation reductazei eritrocitare, după acelaşi principiu ca şi cel utilizat pentru evaluarea rezervelor de tiamină prin testul transcetolazei. Cu cât este mai importantă creşterea activităţii enzimei după adăugarea de FAD la lizatul eritrocitar *in vitro*, cu atât este mai mare gradul de desaturare a apoenzimei şi, deci, deficitul vitaminic.

Tratamentul carenţei manifeste clinic poate fi realizat prin administrarea orală a vitaminei. Cantităţi mai mari de 25 mg nu pot fi absorbite complet, dacă sunt administrate în doză unică. Administrarea parenterală a riboflavinei este limitată de solubilitatea ei scăzută.

6.1.1.3 Vitamina B_6 (piridoxina) şi coenzimele derivate

Piridoxina (a fost denumită vitamina B_6 pentru că la momentul descoperirii se considera că există şi vitaminele B_3, B_4, B_5) este cunoscută şi sub numele de adermină (vindecă dermatita specifică).

Din punct de vedere structural, există trei vitamine care sunt derivaţi ai piridinei (substituită în poziţiile 2, 3 şi 4): piridoxol (piridoxina), piridoxal, piridoxamina (*Figura 6.5*). Este solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă, alcool, acetonă.

Este răspândită în carne, ficat, legume, drojdie de bere, boabe de cereale şi, în cantitate mai mică, în lapte şi ouă. Necesarul este de 1,3 mg/zi, mai mic la copil (0,5-1 mg/zi) şi mai mare în timpul sarcinii şi alăptării (1,9-2 mg/zi), la vârstnici (1,7 mg/zi) şi în stări patologice. Mai mult decât în cazul altor vitamine, necesarul de vitamină B_6 creşte în timpul sarcinii sau administrării de estrogeni. Aceştia se pare că inhibă intervenţia piridoxal fosfatului în metabolismul triptofanului. Necesarul de piridoxină creşte în condiţiile unui aport pro-

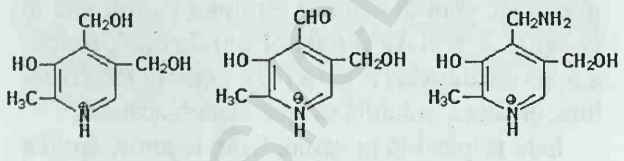
teic mare sau în hemodializă şi dializă peritoneală cronică. Metabolitul etanolului, acetaldehida, deplasează piridoxal fosfatul de pe proteine şi creşte degradarea acestuia.

Se absoarbe uşor în intestinul subţire şi se depozitează în muşchii scheletici. În citoplasma tuturor celulelor organismului are loc transformarea tuturor formelor de vitamină B_6 în piridoxal fosfat (*Figura 6.6*), reacţie catalizată de piridoxal-kinază. Procesele care necesită prezenţa vitaminei B_6 sunt în număr de peste 40, incluzând decarboxilarea, transaminarea, transsulfurarea, glicogenoliza, absorbţia vitaminei B_{12}, degradarea triptofanului, formarea anticorpilor, a acizilor nucleici, echilibrul balanţei Na^+/K^+, funcţia sistemului nervos, a sistemului muscular. Piridoxal fosfatul este necesar, de asemenea, pentru sinteza acidului δ-aminolevulinic, un precursor al hemului.

Mecanismul de acţiune al piridoxal fosfatului este de tip ping-pong, preia o grupare amino ($-NH_2$) de la un aminoacid şi o predă unui α-ceto-acid.

Eliminarea excesului se face pe cale renală, sub forma acidului 4-piridoxic, care poate fi determinat fluorometric. Adultul elimină după un regim echilibrat o cantitate de vitamină B_6 de 400-700 μg/24 ore.

Deficitul de piridoxină prin aport este rar, datorită prezenţei sale în majoritatea alimentelor. Cu toate acestea, deficitul de vitamină este destul de frecvent, datorită acţiunii antagoniste a unor droguri. Izoniazida administrată în tratamentul tuberculozei se combină în organism cu vitamina B_6, formând o hidrazonă solubilă care se elimină prin urină. Cicloserina, penicilamina şi compuşii carbonilici formează complexe cu jumătatea aldehidică a vitaminei, împiedicând



a. b. c.

Figura 6.5. Piridoxina (a), piridoxalul (b) şi piridoxamina (c)

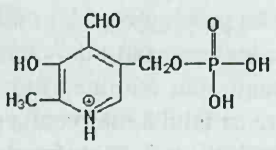


Figura 6.6. Piridoxal fosfatul

funcţionarea normală a coenzimei. În timpul prelucrării industriale a laptelui pentru obţinerea de preparate pentru sugari, conţinutul de piridoxină este redus sau convertit în forme legate de proteine, mai puţin disponibile.

Carenţa determină tulburări nervoase, cardiace, dermatologice (dermatite, acrodinie, descuamarea pielii extremităţilor), ale fanerelor, artrite, diverse forme de anemie. Anomaliile encefalografice apar în decurs de 3 săptămâni de la începerea unei diete sărace în piridoxină, unii pacienţi putând prezenta crize epileptice de tip *grand mal*. Convulsiile, care apar mai ales la sugari, au fost atribuite unui defect genetic care determină scăderea afinităţii de legare a piridoxal fosfatului de o apoenzimă pentru decarboxilaza acidului glutamic. În consecinţă, nu se formează cantităţile necesare de acid γ-aminobutiric, un inhibitor fiziologic al neurotransmisiei. O altă afecţiune ereditară care afectează metabolismul vitaminei B_6 este datorată unei mutaţii a δ-aminolevulinat sintetazei specifice eritrocitare şi are drept consecinţă apariţia unei anemii sideroblastice.

Estimarea biochimică a deficitului vitaminic se poate face prin măsurarea excreţiei metaboliţilor triptofanului, în particular a acidului xanturenic, după testele de încărcare cu triptofan, măsurarea activităţii diverselor transaminaze în sânge şi determinarea excreţiei piridoxinei, metaboliţilor săi sau a oxalatului în urină. Un indicator mai fidel al nivelului piridoxinei poate fi determinarea transaminazei glutamo-piruvice eritrocitare în prezenţa şi în absenţa piridoxal fosfatului adăugat în mediul de reacţie. O creştere cu cel puţin 20% a activităţii enzimei eritrocitare după adăugarea coenzimei specifice, are valoare diagnostică pentru starea carenţială.

Manifestările carenţei de piridoxină se remit consecutiv administrării vitaminei în doze de 2-10 mg/zi. Deficitul vitaminic diagnosticat în timpul sarcinii trebuie tratat cu doze mai mari, de 10-20 mg/zi, datorită necesarului crescut în această perioadă. Suplimentarea aportului de vitamină B_6 a fost raportată ca fiind benefică în tratamentul depresiei la femeile tinere.

Supradozajul se manifestă printr-o toxicitate resimţită mai ales la nivelul SNC prin tulburări neurologice, îndeosebi fenomene de nevrită senzorială şi somnolenţă, cu scăderea nivelului plasmatic al folatului. Tratamentul îndelungat determină fenomene de dependenţă, cu posibilitatea

declanşării unui sindrom de abstinenţă la întreruperea bruscă a administrării vitaminei.

6.1.1.4 Vitamina PP (niacina) şi coenzimele nicotinamidice

Acidul nicotinic (niacina) este o componentă netoxică a nicotinei; acidul nicotinic împreună cu nicotinamida formează vitamina PP (vitamina antipelagroasă) (*Figura 6.7*).

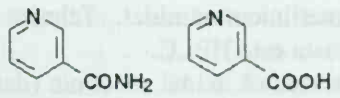
Vitaminele PP sunt substanţe solide, cristaline, incolore, solubile în apă şi în soluţii alcaline.

Sursele principale de niacină sunt carnea, în special viscerele (ficatul), laptele, făina integrală şi unele legume (fasole, mazăre, spanac, cartofi). Acidul nicotinic este stabil la fierberea alimentelor.

Vitamina PP din alimente este absorbită uşor din intestinul subţire şi temporar depozitată în ficat, transportată apoi la ţesuturi unde participă la procesele metabolice. Excesul este eliminat prin urină sub formă de metilnicotinamidă. Coenzimele nicotinamidice NAD^+ şi $NADP^+$ (*Figura 6.8*) sunt coenzime legate labil de diverse enzime implicate în reacţii redox de hidrogenare şi dehidrogenare. Mecanismul de acţiune al acestora constă în participarea în diverse procese metabolice. Astfel NAD^+ este coenzimă în procese catabolice, iar $NADP^+$ este coenzimă în procese anabolice.

Necesarul este în funcţie de aportul energetic: 6,6 mg vitamina PP/1000kcal, respectiv 16 mg la bărbaţi, 14 mg la femei şi 6-12 mg la copii. Necesarul creşte în stări patologice, perioada de creştere, graviditate, alăptare. Dieta zilnică obişnuită conţine doar 10 mg acid nicotinic, dar organismul îşi completează nevoia de vitamină PP prin utilizarea triptofanului, din 60 mg aminoacid obţinând 1 mg acid nicotinic.

Stările de deficit de vitamină, manifestate clinic prin pelagră, se datorează fie carenţei alimentare de acid nicotinic şi triptofan (pelagra primară), fie unor tulburări metabolice care împiedică formarea coenzimelor corespunzătoare, fie consumului sau pierderii excesive a acidului nicotinic (pelagră secundară). Pelagra este o afecţiune emaciantă şi a fost denumită „boala celor trei D", fiind asociată tipic cu dermatită, diaree şi demenţă. Dermatita este bilaterală, simetrică şi apare în zonele expuse luminii solare, fiind fotosensibilă. Leziunile cutanate sunt caracterizate prin hiperkeratoză, descuamare şi hiperpigmentare. Diareea rezultă prin generalizarea inflamaţiei la nivelul mucoaselor. Alte anomalii ale mucoaselor includ stomatită, glosită, enterită, proctită, aclorhidrie, vaginită. Semnele psihice sunt pronunţate: fatigabilitatea, apatia şi insomnia pot preceda instalarea encefalopatiei, caracterizate prin confuzie, halucinaţii, dezorientare, amnezie şi, în cele din urmă, psihoză organică. Tulburările psihice se pot datora scăderii conversiei triptofanului în serotonină.



a. b.

Figura 6.7. Nicotinamida (a) şi acidul nicotinic (b).

Pelagra secundară este rară şi poate apărea în cadrul sindroamelor de malabsorbţie, la alcoolici, hipertiroidieni, în prezenţa sindromului carcinoid, în aminoacidurii şi sub tratament cu izoniazidă. Pelagra secundară apare în boala Hartnup datorită unui defect ereditar în absorbţia mai multor aminoacizi, printre care şi triptofanul. În sindromul carcinoid, aproximativ 60% din triptofan este transformat, pe o cale metabolică secundară, în 5-hidroxitriptamină la nivelul ţesutului tumoral. În toate aceste cazuri, pelagra se datorează scăderii disponibilităţii echivalenţilor niacinei.

Majoritatea simptomelor se remit rapid şi spectaculos după administrarea de preparate de vitamină PP. Nicotinamida este mai avantajoasă decât acidul nicotinic în tratamentul pelagrei, deoarece este mai bine tolerată de pacient.

În carenţa de niacină, nivelul plasmatic al triptofanului şi coenzimele NAD şi NADP eritrocitare sunt scăzute. În practică, diagnosticul carenţei poate fi susţinut prin determinarea excreţiei urinare a metaboliţilor niacinei, mai pre-

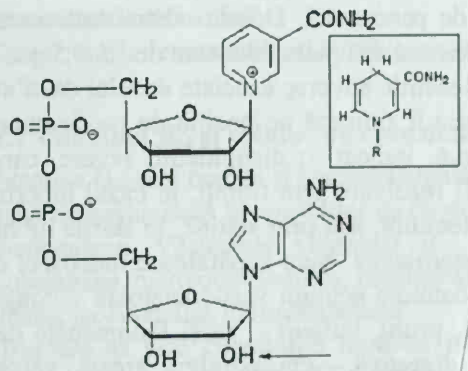


Figura 6.8. Structura NAD^+. Săgeata indică gruparea –OH fosforilată în structura $NADP^+$. În casetă este reprezentată structura NADH.

cis a N-metilnicotinamidei. Tehnica preferată pentru aceasta este HPLC.

S-a observat că acidul nicotinic (dar nu şi nicotinamida) poate avea efect hipolipemiant. Mecanismul acestui efect este incomplet cunoscut. O acţiune importantă este inhibarea formării de VLDL în ficat. La aceasta contribuie scăderea disponibilităţii atât a acizilor graşi, prin inhibarea lipolizei, cât şi a trigliceridelor, ale căror sinteză şi transport sunt reduse. În plus, prin stimularea activităţii lipoproteinlipazei, este intensificată epurarea VLDL. Ca urmare a scăderii nivelului VLDL, se produce şi diminuarea LDL. Sinteza şi eliminarea biliară de colesterol rămân nemodificate.

Administrarea acidului nicotinic în doze mari reduce rapid, în decurs de câteva zile, concentraţia trigliceridelor şi colesterolului în plasmă. Scăderea trigliceridelor este cu atât mai intensă cu cât nivelul lor este mai mare, această reducere putând ajunge între 20 şi 80%. LDL colesterolul scade cu aproximativ 25%, efectul începând la 5-6 zile de la începerea administrării şi atingând maximul la 3-5 săptămâni. În condiţiile tratamentului prelungit, concentraţia HDL colesterolului poate creşte cu 15-30%.

Acidul nicotinic are, de asemenea, un efect de scădere a concentraţiei fibrinogenului plasmatic şi de creştere a nivelului activatorului tisular al plasminogenului.

Acidul nicotinic este un hipolipemiant activ şi cu spectru larg, putând fi utilizat în tratamentul hiperlipoproteinemiei de tip mixt, disbetalipoproteinemiei, hipertrigliceridemiei poligenice sau familiale, hipercolesterolemiei familiale şi al altor forme de hipercolesterolemie. O indicaţie particulară o constituie cazurile de hiperlipoproteinemie de tip V, rezistente la fibraţi, unde poate preveni recurenţele de pancreatită. Dozele administrate uzual în tratamentul dislipidemiilor sunt de 1,5-3,5 g/zi.

Reacţiile adverse asociate dozelor mari administrate îl situează pe poziţia de medicament de rezervă, indicat în dislipidemii severe, care nu pot fi rezolvate prin fibraţi, în cazul hipertrigliceridemiilor, sau prin statine, în stările de hipercolesterolemie. Sunt supărătoare îndeosebi efectele datorate acţiunii vasodilatatoare – congestia pielii, prurit, bufeuri -, ca şi fenomenele de iritaţie digestivă – epigastralgii, greaţă, vărsături, diaree. Se poate produce o creştere a enzimelor hepatice. Evitarea sau diminuarea acestor efecte nedorite poate fi obţinută prin începerea tratamentului cu doze mici, de 100 mg, de trei ori pe zi, administrate după mese. Disconfortul produs de acidul nicotinic se atenuează după câteva săptămâni de la începerea tratamentului.

Administrarea acidului nicotinic are drept consecinţă şi scăderea depozitelor de glicogen şi lipide la nivelul fibrelor musculare cardiace şi scheletice, creşte nivelul glucozei plasmatice şi producţia de acid uric. Prin urmare, administrarea acidului nicotinic în tratamentul hipercolesterolemiei este contraindicată la pacienţii diabetici şi la cei care suferă de gută.

6.1.1.5 Acidul pantotenic (vitamina B_5) şi coenzima A (CoA)

Este foarte răspândit în ţesuturile animale şi vegetale, prefixul „pan" însemnând „peste tot", fiind vitamină pentru om şi factor de creştere pentru microorganisme.

Structural, acidul pantotenic este format din acid pantoic şi β-alanina (acidul dihidroxidimetilbutiric) (*Figura 6.9*). Proprietăţile fizice constau în solubilitate în apă, culoare galbenă, vâscozitate crescută.

Sursele sunt reprezentate de gălbenuşul de ou, viscere, boabe de cereale, dar poate fi sintetizat şi de flora bacteriană intestinală. Aportul zilnic recomandat la adult este de 5 mg/zi, fiind mai mic la copii şi crescut în timpul sarcinii şi alăptării.

Se absoarbe uşor la nivelul intestinului subţire, fiind transportat în sânge în întreg organismul; în ţesuturi este fosforilat sub acţiunea unei kinaze specifice iar apoi, printr-o serie de alte reacţii, rezultă CoA (*Figura 6.10*) (în creier, kinaza este inhibată). Acidul pantotenic nemodificat este eliminat prin urină.

Mecanismul de acţiune constă în formarea unei legături tioesterice macroergice în procesele de sinteză sau degradare (acizi graşi, colesterol, catene hidrocarbonate).

Carenţa este extrem de rară, datorită largii răspândiri a acidului pantotenic în natură. Simptomele carenţei provocate experimental constau în tulburări neurologice (parestezii în extremităţi, mialgii, cefalee, oboseală, tulburări de

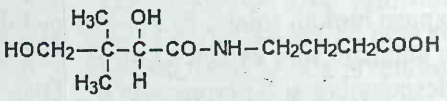


Figura 6.9. Acidul pantotenic

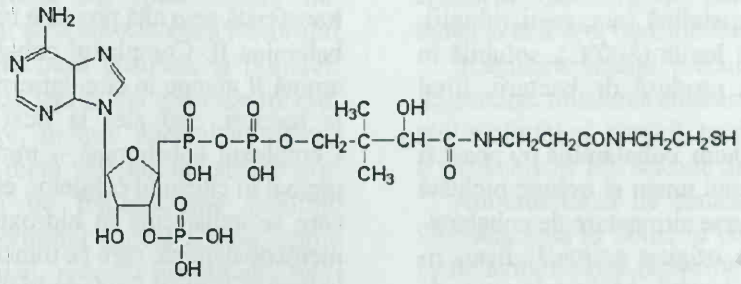


Figura 6.10. Structura coenzimei A

somn), tulburări digestive (dureri abdominale, crampe, vărsături), manifestări cutanate (dermatită, acromotrichie), infecţii respiratorii, cutanate, datorate capacităţii scăzute de sinteză a anticorpilor.

6.1.1.6 Biotina (vitamina B_8 sau H)

Este vitamină pentru organismele superioare şi factor de creştere pentru cele inferioare (ciuperci, bacterii, levuri).

Din punct de vedere structural, vitamina B_8 este formată dintr-un ciclu imidazolic hidrogenat saturat, un ciclu tiofenic hidrogenat şi un rest de acid valerianic (*Figura 6.11*).

Este solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă, stabilă termic, poate fi descompusă de acizi sau baze.

Sursele principale de biotină sunt ficatul, gălbenuşul de ou, laptele, orezul nedecorticat; practic, există în toate celulele vii animale şi vegetale (în cantităţi foarte mici) şi poate fi sintetizată de bacteriile intestinale.

Un aport zilnic de 30 μg/zi este considerat adecvat pentru adult. Sinteza de către bacteriile din tubul digestiv depăşeşte cu mult aportul, eliminarea prin urină şi fecale fiind mai mare decât aportul dietetic.

Biotina este absorbită din alimente la nivelul intestinului subţire.

Rolul de coenzimă al biotinei constă în participarea, alături de carboxilaze, în metabolismul glucidic (transformarea piruvatului în oxaloacetat, formarea acizilor graşi, degradarea acizilor graşi). CO_2 participă la reacţiile de carboxilare doar în forma activată, legată de biotină. Exemplu: piruvat carboxilaza → oxaloacetat, acetil-CoA carboxilaza → malonil-CoA, propionil-CoA carboxilaza → succinil-CoA.

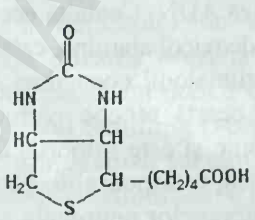


Figura 6.11. Structura biotinei

Avidina din albuşul de ou crud leagă stabil, ireversibil, biotina (prin denaturare efectul este împiedicat). Acest fapt explică apariţia fenomenelor carenţiale la persoane care consumă timp îndelungat ouă crude. Stări de deficit mai pot apărea la bolnavii alimentaţi parenteral pe lungă durată, prezentând concomitent afecţiuni intestinale sau aflaţi sub tratament prelungit cu antibiotice (care nu permit sinteza vitaminei de către flora intestinală) şi la sugarii cu seboree.

Carenţa determină o simptomatologie cutanată, manifestată prin: dermatită, alopecie, glosită atrofică, musculo-nervoasă cu hiperestezie, ataxie, dureri musculare, oboseală, insomnii, depresii nervoase şi inapetenţă. La copii se produce întârzierea dezvoltării psihice. În plus, deficitul de multiple carboxilaze poate produce afectare neurologică severă şi eliminare urinară de acizi organici. Diagnosticul se poate stabili prin demonstrarea scăderii excreţiei urinare a biotinei sau prin rezoluţia manifestărilor clinice consecutiv administrării de biotină.

Nu se cunosc fenomene toxice determinate de supradozaj.

6.1.1.7 Vitamina B_{12} şi rolul ei de coenzimă

Vitamina B_{12} este numită şi ciancobalamină, sau vitamină antipernicioasă la om, factor de creştere la microorganisme. Vitamerele vitaminei B_{12} sunt ciancobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina, adenozilcobalamina, nitrocobalamina.

Structura sa este constituită dintr-un nucleu porfirinic centrat de un atom de cobalt, de care este legată o grupare de tip adenozinic şi o grupare cian - pentru ciancobalamină sau hidroxi - pentru hidroxicobalamină (*Figura 6.12*).

BCU IAŞI OPEN ACCESS LIBRARY

Proprietăţile fizice mai importante sunt: este o substanţă solidă, cristalină (ace roşii rubinii), stabilă la temperaturi înalte (300°C), solubilă în apă, ciancobalamina, produsă de bacterii, fiind forma cea mai stabilă.

Spre deosebire de hem, cobalamina nu poate fi sintetizată de organismul uman şi trebuie preluată din dietă. Singurele surse alimentare de cobalamină sunt produsele de origine animală: ficat, rinichi, peşte, produse lactate. Moluştele sunt, de departe, cele mai bogate în vitamină B_{12}. Anumite procese fermentative degradează cobalamina, astfel încât iaurtul nu conţine această vitamină.

Aportul zilnic de vitamină B_{12} recomandat pentru adult este mic, de aproximativ 2,4 μg/zi. Este preferabil un consum regulat de alimente care conţin cobalamină, deoarece absorbţia intestinală maximă este de 3 μg/zi.

Cobalamina din alimente este eliberată în timpul digestiei gastrice şi formează un compus stabil cu receptorul R gastric. Receptorul R aparţine unui grup de glicoproteine prezente în plasmă, fagocite şi secreţii (salivă, suc gastric, lapte etc.), funcţia lor nefiind pe deplin elucidată. Complexul cobalamină - factor R este digerat la nivelul duodenului, eliberând cobalamina, denumită şi factor extrinsec, care se leagă apoi de factorul intrinsec produs de celulele parietale gastrice. Complexul cobalamină – factor intrinsec este rezistent la acţiunea enzimelor digestive şi ajunge la nivelul ileonului distal, unde există receptori specifici pe suprafaţa celulelor mucoasei. În acest proces, factorul intrinsec joacă rol de proteină transportoare către celule. Complexul cobalamină – factor intrinsec se leagă de receptorii specifici, este preluat de enterocitele ileale, unde

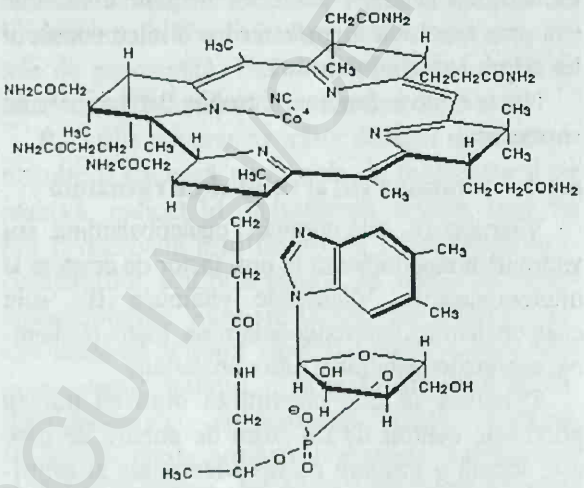


Figura 6.12. Structura ciancobalaminei

factorul intrinsec este distrus şi cobalamina este transferată pe o altă proteină transportoare, transcobalamina II. Complexul cobalamină – transcobalamină II ajunge în circulaţie şi este distribuit rapid la ţesuturi, mai ales la ficat şi măduva osoasă. Complexul cobalamină – transcobalamină II este preluat în citosolul celulelor, eliberând cobalamina, care se transformă în hidroxicobalamină, apoi în metilcobalamină, care se transformă în adenozilcobalamină la nivel mitocondrial.

Cobalamina este stocată în special în ficat, organismul dispunând la acest nivel de un depozit de aproximativ 3 mg şi de încă 2 mg în alte ţesuturi. Având în vedere necesarul zilnic de vitamină, organismul dispune de o rezervă suficientă pentru o perioadă de 3-6 ani, în cazul în care absorbţia de cobalamină ar înceta brusc. Aparent paradoxal, deşi cobalamina nou absorbită este legată de transcobalamina II, majoritatea cobalaminei din sânge se găseşte legată de transcobalamina I, o glicoproteină înrudită cu factorul R gastric. Explicaţia constă în faptul că vitamina legată de transcobalamina II este rapid preluată din circulaţie, timpul de înjumătăţire fiind de aproximativ o oră, pe când clearance-ul cobalaminei legate de transcobalamina I durează câteva zile.

Concentraţia plasmatică normală a vitaminei este 200-900 pg/mL.

La oameni există două forme metabolic active de cobalamină, deosebite prin grupul alchil ataşat la poziţia a şasea coordinativă a atomului de cobalt: metilcobalamina şi adenozilcobalamina. Rolul de coenzimă al acestora este evident în procesele de transmetilare şi izomerizare.

Vitamina B_{12} este esenţială pentru replicarea ADN. Consecutiv, ea intervine în creşterea şi maturarea celulară. Această acţiune se manifestă prin intermediul folaţilor activi. Cobalamina funcţionează ca acceptor de grupări metil, cu formare de metilcobalamină, în reacţia de transformare a metiltetrahidrofolatului în tetrahidrofolat. Tetrahidrofolatul interacţionează cu 5-10-metilentetrahidrofolatul şi dihidrofolatul, contribuind la sinteza timidilatului din dezoxiuridilat, reacţie majoră în sinteza ADN. Cealaltă coenzimă activă a cobalaminei, deoxicobalamina, catalizează transformarea L-metilmalonil coenzimei A în succinil coenzima A. Această reacţie permite utilizarea acidului propionic şi este importantă pentru sinteza acizilor graşi, indispensabili pentru structura normală a membranelor neuronale şi a tecilor de mielină din sistemul nervos central.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR

Carenţa de vitamină B_{12} apare relativ rar. Principala cauză este absenţa secreţiei factorului intrinsec de către mucoasa gastrică, la bolnavii cu anemie pernicioasă sau la cei gastrectomizaţi. Alte cauze, mai rare, includ: aportul alimentar inadecvat (la cei cu dietă vegetariană strictă prelungită), sindroame de malabsorbţie datorate afectării ileonului terminal (boală Crohn, sprue tropical şi non-tropical, rezecţii intestinale, neoplasme, malabsorbţie selectivă a cobalaminei – sindromul Imerslund), competiţie pentru cobalamină (infestaţie cu *Diphilobotrium latum*, sindrom de ansă oarbă, diverticuli jejunali multipli, fistulă intestinală), administrare de medicamente (acid p-aminosalicilic, colchicină, neomicină) şi absenţa congenitală a transcobalaminei II.

În deficitul de cobalamină, aproape toată cantitatea de folat din organism este sub formă de N^5-metiltetrahidrofolat, care nu poate fi convertit în alţi derivaţi ai tetrahidrofolatului. Acest fenomen a fost denumit „capcana folaţilor".

Avitaminoza B_{12} se manifestă prin anemie megaloblastică, afecţiuni ale tractului gastrointestinal şi leziuni neurologice. Manifestările gastrointestinale – anorexie, senzaţie de arsură la nivelul limbii, care apare roşie şi depapilată, cu aspect „lăcuit", pierdere ponderală însoţită eventual de diaree – se pot datora afectării epiteliului gastrointestinal, rapid proliferativ, prin scăderea sintezei ADN-ului. Manifestările neurologice sunt cele mai îngrijorătoare, deoarece nu se remit complet după tratament. Acestea încep cu demielinizare, degenerare axonală şi, în final se produce moartea neuronului. Sediile afectate includ nervii periferici, măduva spinării, unde are loc demielinizarea cordoanelor posterioare şi laterale, uneori fiind afectat şi encefalul. Semnele şi simptomele cuprind astenie, ataxie, parestezii ale extremităţilor, iar afectarea mentală poate varia de la hipomnezie şi iritabilitate la demenţă severă sau psihoză. Important de subliniat este faptul că afectarea neurologică poate apărea la un individ cu indici eritrocitari şi hematocrit normale.

Diagnosticul deficitului de cobalamină se poate face prin dozarea acesteia în ser (valori sub 100 pg/mL indică un deficit cu semnificaţie clinică), prin testul Schilling (vezi *Capitolul 22*) sau, indirect, prin analiza sucului gastric (aclorhidria rezistentă la stimulare cu pentagastrină sau histamină apare în anemia pernicioasă). De asemenea, în carenţa de cobalamină poate apărea creşterea concentraţiilor plasmatice ale homocisteinei şi acidului metilmalonic.

În anumite situaţii, precum deficitul de acid folic, sarcina, utilizarea contraceptivelor orale, mielomul multiplu şi, posibil, terapia cu antibiotice, pot fi găsite nivele fals scăzute de vitamină B_{12}.

Administrarea de ciancobalamină sau hidroxicobalamină la bolnavii cu diverse forme clinice de avitaminoză B_{12} provoacă o ameliorare clinică şi biologică spectaculoasă. Complicaţiile neurologice recente pot dispărea în câteva săptămâni, dar cele vechi sunt greu influenţate.

6.1.2 Alte vitamine hidrosolubile

6.1.2.1 Acidul folic şi coenzimele derivate (vitamina M, B_C)

Acidul folic a fost extras pentru prima dată din frunzele de spanac. Există mai multe vitamere cu rol de vitamine pentru organismele superioare şi factor de creştere pentru microorganisme.

Structural este un pteroilglutamat, format din pteridina substituită, acid para-aminobenzoic şi glutamat. Există şi sub forma de pteroiltriglutamat şi pteroilheptaglutamat.

Este solid, cristalin, galben, puţin solubil în apă, solubil în soluţii alcoolice diluate.

Sursele mai importante de acid folic sunt ficatul, rinichiul, peştele, vegetalele verzi, nu şi fructele.

Aportul zilnic recomandat pentru adult este de 400 μg, 600 μg în sarcină, 500 μg în timpul alăptării şi în stările de stres sau în maladii.

Acidul folic este un pteroilmonoglutamat (*Figura 6.13*). Folaţii din multe surse alimentare sunt conjugaţi în mare parte cu derivaţi ai acidului glutamic, absorbţia lor în această formă fiind împiedicată. Pteroilpoliglutamaţii alimentari sunt hidrolizaţi în tractul digestiv de hidrolaze specifice (folilpoliglutamat-hidrolaze), fiind convertiţi în mono- şi diglutamat, care sunt absorbiţi cu uşurinţă în jejunul proximal. Procesul de absorbţie este complex (puţin acid folic se absoarbe ca atare), acidul folic fiind hidrogenat, rezultând tetrahidrofolat şi metilat, rezultând metiltetrahidrofolat. În plasmă, 2/3 din acidul folic

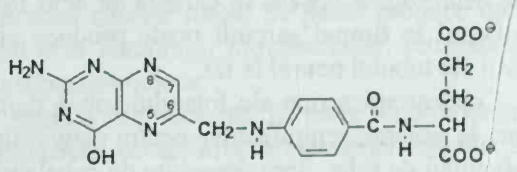


Figura 6.13. Acidul folic

este cuplat cu o proteină transportoare, neeliminându-se în urină. Concentraţia plasmatică normală este de 4-20 ng/mL.

În celule, metiltetrahidrofolatul cedează gruparea metil către cobalamină, rezultând tetrahidrofolat, care serveşte drept acceptor de grupări de carbon şi formează diferite coenzime importante pentru organism. Cele mai importante molecule la sinteza cărora participă acidul folic sunt: purinele, în care atomii C_2 şi C_8 sunt introduşi prin reacţii dependente de folat, deoxitimidilat monofosfat (dTMP), sintetizat din $N^{5,10}$-metilentetrahidrofolat şi deoxiuridilat monofosfat (dUMP) şi metionina, formată din transferul unei grupări metil de pe N^5-metiltetrahidrofolat pe homocisteină. Tetrahidrofolatul este produs în toate reacţiile de transfer al radicalilor monocarbonici, cu o excepţie: reacţia mediată de timidilat sintetază (dUMP→dTMP), în care se produce dihidrofolat. Acesta trebuie redus la tetrahidrofolat de către enzima dihidrofolat reductază, pentru a putea reintra în circuitul metabolic.

Carenţa de acid folic poate apărea în ciroza hepatică de cauză alcoolică (insuficienţa depozitării şi formării de folaţi activi), la alcoolici (alcoolul inhibă absorbţia şi activarea folatului), la hipertiroidieni, în sindroamele de malabsorbţie, la bolnavii cu anemie hemolitică cronică, în caz de necesităţi crescute neasigurate de aportul alimentar (în timpul sarcinii, în timpul puseelor de creştere din copilărie şi adolescenţă). Tratamentul îndelungat cu fenobarbital sau fenitoină creşte nevoia de folaţi, probabil prin inducţia enzimatică produsă de aceste medicamente. Anumite medicamente inhibă formarea folaţilor activi. Cel mai toxic este metotrexatul, un inhibitor puternic al dihidrofolat reductazei. Alţi inhibitori mai slabi ai acestei enzime includ pentamidina, pirimetamina, trimetoprimul şi triamterenul.

Carenţa determină o simptomatologie asemănătoare cu cea asociată deficitului de cobalamină. Manifestările gastrointestinale sunt mai frecvente şi mai severe decât cele din anemia pernicioasă. Manifestările hematologice sunt aceleaşi ca în deficitul de cobalamină. Totuşi, manifestările neurologice lipsesc în carenţa de acid folic. Deficitul în timpul sarcinii poate produce anomalii ale tubului neural la făt.

Concentraţii serice ale folatului sub 4 ng/mL sunt, în general, semnificative pentru diagnosticul deficitului de folat. Spre deosebire de cobalamina serică, nivelul folatului seric poate reflecta modificări recente ale aportului alimentar. Nivelul de folat din eritrocite este un indicator mai bun al rezervelor tisulare de folat decât nivelul seric al acestuia, deoarece nu este influenţat de fluctuaţiile aportului prin dietă. În deficitul de vitamină B_{12}, folatul este blocat în forma sa neconjugată, rezultând o scădere a folatului în hematii. Prin urmare, deficitul de cobalamină poate determina o valoare fals scăzută a nivelului de folat eritrocitar, dar nivelul seric este normal sau crescut.

În deficitul de folat creşte în ser nivelul homocisteinei, nu şi cel al acidului metilmalonic, spre deosebire de carenţa de cobalamină, unde creşte nivelul amândorura.

Îmbunătăţirea statusului acidului folic poate fi obţinută printr-o dietă bogată în folat (legume şi citrice), prin suplimentare cu acid folic sintetic (acid pteroilmonoglutamic), care este termostabil şi are biodisponibilitate mai mare, sau prin îmbogăţirea cu acid folic a alimentelor.

În general, suplimentarea aportului de folat este considerată sigură. Totuşi, există o anumită rezervă în privinţa administrării acidului folic la persoanele cu deficit subclinic de cobalamină, afecţiune relativ frecvent întâlnită la vârstnici şi la persoanele strict vegetariene. La aceşti pacienţi, terapia cu acid folic poate masca manifestările hematologice ale bolii şi permite progresia leziunilor neurologice.

6.1.2.2 Vitamina C (acidul ascorbic)

Structural, vitamina C este γ-lactona acidului L-gulonic (*Figura 6.14*). Este o substanţă solidă, cristalină, albă, solubilă în apă, rezultând soluţii acide (datorată H^+ provenit de la gruparea –OH enolică). Absoarbe razele UV, fiind optic activă, levogiră. Este stabilă la temperaturi mici şi este cea mai labilă vitamină la temperaturi mari.

Se găseşte în lapte, unele sortimente de carne (rinichi, ficat, peşte) şi este larg răspândită în legume (cartofi, varză) şi fructe proaspete (citrice, pepene galben, măceşe). O parte din conţinutul de vitamină C al alimentelor se pierde prin uscare, con-

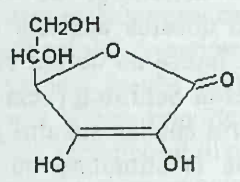


Figura 6.14. Acidul ascorbic

servare sau fierbere, chiar şi prin depozitarea îndelungată a fructelor şi legumelor neprelucrate.

Necesarul este de aproximativ 1,25 mg/kgcorp/zi pentru adultul sănătos. Este mai mare la copil, la femeile gravide, în alăptare, în stări patologice (infecţii virale, tumori, boli cardiovasculare, stres, intervenţii chirurgicale, accidente). La fumători, nicotina împiedică absorbţia vitaminei C în proporţie de 30% şi scade ascorbemia chiar în prezenţa unui aport alimentar normal de vitamina C. Supradozajul determină tulburări ale absorbţiei intestinale a altor vitamine, calculi urinari, disurie, erupţii cutanate.

Metabolismul vitaminei C în organism începe cu absorbţia intestinală rapidă. Absorbţia este scăzută sau împiedicată de antibiotice, cortizol, aspirină, calmante, stres, temperaturi înalte, fumul de ţigară sau ulei ars. Se absoarbe doar în forma redusă, transportându-se ca atare în sânge. Ascorbemia variază puţin cu cantitatea ingerată şi la indivizii sănătoşi este de 0,6-1,5 mg/dL, respectiv 34-85 µmol/L. Excesul este eliminat rapid prin urină, în cantitate de 5-55 mg/urina de 24 de ore (mg/dL x 56,8 = µmol/L, µmol/L x 0,0176 = mg/dL). Pragul de eliminare renală este de 1,5 mg/dL.

Megadozele de vitamină C rămân aproape în totalitate neabsorbite în tractul gastro-intestinal, iar cantitatea absorbită este rapid metabolizată la nivel hepatic. În organism, se poate transforma în acid oxalic care se elimină prin urină, predispunând la formarea de calculi urinari.

Acidul ascorbic şi acidul dehidroascorbic formează un sistem redox, intervenind în reacţii de oxidare şi în alte procese metabolice. Cea mai bine înţeleasă funcţie este cea a sintezei colagenului, intervenind în hidroxilarea prolinei, cu producerea hidroxiprolinei, un constituent principal al acestuia. Absenţa vitaminei C produce alterarea peptidil-hidroxilării procolagenului. Colagenul nehidroxilat nu poate forma tripla spirală necesară unei structuri tisulare normale. Acidul ascorbic previne oxidarea tetrahidrofolatului, protejând astfel rezerva de folat activ, reglează absorbţia, distribuţia şi depozitarea fierului, menţine raportul feritină/hemosiderină în limite normale. De asemenea, participă la formarea carnitinei, aminoacid indispensabil transportului acizilor graşi în mitocondrii pentru beta-oxidare, la formarea acidului homogentizic în cadrul metabolismului tirozinei, la transformarea dopaminei în noradrenalină şi a triptofanului în hidroxitriptofan, precursor al serotoninei. În sistemul endocrin, vitamina C intervine în steroidogeneza corticosuprarenală şi favorizează aminarea unor hormoni peptidici, ca oxitocina, vasopresina şi colecistokinina. Concentraţiile acidului ascorbic în plasmă sunt în relaţie inversă cu unii markeri ai inflamaţiei, precum proteina C reactivă. Date recente sugerează că vitamina C ar avea şi efecte antiinflamatorii.

Vitamina C este secretată în mod activ în sucul gastric, unde împiedică transformarea nitriţilor proveniţi din salivă, în compuşi N-nitrozo, potenţial carcinogeni.

Lipsa legumelor şi a fructelor proaspete din alimentaţie determină în decurs de 4-5 luni, apariţia unei boli carenţiale cunoscute sub denumirea de *scorbut*. Scorbutul poate fi întâlnit la om şi la câteva specii de animale, printre care primatele, cobaiul şi liliacul, deoarece, aceste specii prezintă o mutaţie genetică ce a dus la lipsa enzimei L-gluconolacton oxidaza necesare în sinteza acidului ascorbic din D-glucoză. Prin urmare, necesitatea aportului exogen de acid ascorbic la om este rezultatul unei erori înnăscute în metabolismul glucidic.

Actualmente, scorbutul apare rar. O incidenţă crescută există la vârsta de 6-12 luni la copiii alimentaţi cu formule de lapte fără diversificare cu sucuri de fructe şi legume. Un alt vârf de incidenţă apare la vârstele medii şi avansate. Bătrânii, alcoolicii sau cei dependenţi de droguri sunt predispuşi la a face boala.

Multe manifestări clinice ale scorbutului sunt rezultatul defectului apărut în sinteza colagenului. Colagenul cu conţinut mare de hidroxiprolină este cel mai afectat, fenomen răspunzător de alterarea precoce a adventicei, mediei şi membranei bazale la nivelul vaselor de sânge. Manifestările evoluează în paralel cu scăderea depozitelor de vitamină din organism. La adult, boala se manifestă prin gingivită, cu edeme şi hemoragii, tulburări ale dentiţiei, hiperkeratoză foliculară, hematoame cutanate, musculare şi articulare, anemie, întârzierea vindecării plăgilor, hemoragii viscerale peteşiale, afectare psihică. În final, icterul, edemele şi febra apar frecvent, convulsiile şi hipotensiunea putând conduce brusc la deces. La copii, se poate produce separare epifizară prin hemoragii subperiostale la nivelul oaselor lungi. Se poate produce deces rapid prin hemoragii intracerebrale, retrobulbare sau subarahnoidiene.

Anemia este frecventă. Ea poate fi normocromă, normocitară, consecutivă hemoragiilor repetate, dar se poate întâlni şi anemie macrocitară sau megaloblastică, în cazul asocierii cu deficit de folat.

Concentraţia acidului ascorbic poate fi determinată în mod direct în ser sau plasmă prin metode spectrofotometrice sau flourometrice. Nivele sub 0,1 mg/dL sunt sugestive pentru deficitul vitaminic. Nivelul seric poate fi redus la fumători, la unele femei care folosesc contraceptive orale şi la pacienţii cu boli digestive cronice. Determinarea nivelului acidului ascorbic în ser este mai puţin utilă în diagnosticul scorbutului decât dozarea în leucocite sau trombocite.

Scorbutul este potenţial fatal. Dacă se suspicionează acest diagnostic, se recoltează sânge şi se instituie prompt tratament cu acid ascorbic. Manifestările bolii se remit rapid, sângerările spontane dispărând în 24 ore.

Megadoze de vitamină C au fost administrate pacienţilor cu cancer, dar eficacitatea intervenţiei nu a fost demonstrată. Unele studii efectuate *in vitro* sugerează faptul că doze mari de acid ascorbic nu sunt recomandate, deoarece pot accelera metabolismul tumoral.

Există un risc variabil de toxicitate în urma administrării unor doze care depăşesc 1-2 g/zi. Întrucât acidul oxalic este metabolitul direct al acidului ascorbic, există riscul teoretic de apariţie a calculilor renali asociat consumului de vitamină C în cantităţi mari.

Vitamina C trebuie administrată cu prudenţă la persoanele cu hemocromatoză sau celor cu risc de a dezvolta boala, deoarece absorbţia intestinală şi depozitarea tisulară a fierului poate fi crescută exagerat. Întrucât gena hemocromatozei este una dintre cele mai frecvente anomalii genetice cunoscute, folosirea nerațională în populaţia generală a unor doze mari de vitamina C ca supliment alimentar poate avea consecinţe nefaste.

6.2 Vitaminele liposolubile

Grupa vitaminelor liposolubile cuprinde vitaminele A, D, E şi K. Cinetica lor se caracterizează prin reţinerea în organism timp îndelungat, cu formarea de depozite în special la nivel hepatic. Acest fapt explică apariţia tardivă a simptomelor deficitului vitaminic în condiţiile unei carenţe îndelungate. Administrarea în doze exagerate determină acumularea lor şi apariţia fenomenelor toxice.

6.2.1 Vitamina A (retinolul)

Retinolul este derivatul care intră în structura celulelor cu bastonaşe din retină, cu rol în vederea crepusculară. Este denumită şi axeroftol, deficienţa vitaminei A determinând xeroftalmie. Retinoidele sunt o grupă de vitamine naturale şi sintetice analoge retinolului. Este un compus poliizoprenic cu un nucleu ciclohexen (*Figura 6.15*). Se prezintă ca o substanţă galben-roz în alimente.

Vitamina A este adusă în organism prin aport alimentar sau poate fi sintetizată din caroten vegetal. Sursele de retinol sunt reprezentate de alimentele bogate în grăsimi, precum ficatul, rinichii, untul şi gălbenuşul de ou, unde se află în mare măsură sub formă de retinol palmitat. Substratul carotenic pentru sinteza vitaminei A este larg răspândit în regnul vegetal, îndeosebi morcovii şi roşiile fiind bogate în β-caroten.

Necesarul alimentar de vitamină A este de 0,9 mg/zi la bărbaţi, 0,7 mg/zi la femei, 0,3-0,4 mg/zi la copil şi creşte în sarcină, alăptare şi infecţii până la 1,3 mg/zi. O unitate internaţională de vitamina A reprezintă 0,344 μg (1 mg ~ 3000 UI).

Retinolul şi esterii săi se absorb repede şi aproape în totalitate la nivelul intestinului. Palmitatul şi alţi esteri sunt hidrolizaţi în intestin de către enzimele pancreatice. Carotenoizii, în schimb, sunt slab absorbiţi în intestin (doar 30% din cantitatea ingerată). Totuşi, absorbţia carotenoizilor poate fi crescută dacă legumele sunt preparate sub formă de piure sau gătite cu grăsime.

Retinolul se absoarbe prin mecanism activ, proces facilitat de către o proteină citosolică specifică – CRBP II (*cellular retinol binding protein II*). În caz de tulburări ale digestiei şi absorbţiei lipidelor, absorbţia vitaminei A este micşorată. După ce este absorbit în formă liberă, retinolul este reesterificat cu acizi graşi în mucoasa intestinală şi intră în circulaţie prin limfă, sub formă de chilomicroni. Beta-carotenul se absoarbe ca atare sau clivat în tractul intestinal, formând două molecule de retinaldehidă. Oricare ar fi sursa retinolului, acesta este depozitat în ficat sub formă esterificată. Rezerva normală hepatică este suficientă pentru câteva luni. Înainte de a părăsi ficatul, retinilesterii sunt hidrolizaţi, iar retinolul liber se leagă în plasmă, în proporţie de minim 90%, de o α_1-globulină, RBP (*retinol binding protein*). Concentraţia plasmatică fiziologică a retinolului are valori de 30-70 μg/100 ml. Retinolul legat de RBP se fixează pe receptorii specifici de pe suprafaţa celulelor ţintă, de unde este transferat către o altă proteină, CRBP citosolic. Complexul CRBP – retinol eliberează retinolul, care este transformat în compuşi activi în funcţie de tipul ţesutului ţintă: la nivelul retinei, se formează retinal şi rodopsină, în ţesutul epite-

lial se formează acid retinoic. Retinolul, retinalul şi acidul retinoic sunt în parte glucuronoconjugaţi în organism şi se elimină prin urină şi prin scaun.

Cel mai cunoscut rol al vitaminei A este cel în acuitatea vizuală. În retină, vitamina A constituie gruparea prostetică a proteinelor carotenice care furnizează baza moleculară a excitaţiei vizuale. La întuneric, cis-retinalul împreună cu o lipoproteină specifică – opsina – formează rodopsina, pigmentul fotosensibil din celulele cu bastonaşe, care predomină în zona periferică a retinei, sensibilă la iluminarea slabă (vederea crepusculară). În prezenţa luminii, rodopsina suferă o reacţie de fotodescompunere, care iniţiază un potenţial receptor care se dezvoltă în domeniul extern al celulelor retiniene. Potenţialul receptor se transmite la domeniul intern al celulelor cu bastonaşe, unde se dezvoltă potenţialul de acţiune.

Vitamina A deţine un rol important în creşterea şi diferenţierea ţesuturilor epiteliale. Efectul se datorează modulării procesului de transcripţie genică: acidul retinoic rezultat din retinol prin oxidare se fixează pe o proteină celulară specifică – CRABP (*cellular retinoic acid binding protein*), iar complexul rezultat acţionează asupra receptorilor nucleari specifici aparţinând familiei receptorilor pentru hormoni steroizi, vitamină A şi hormoni tiroidieni.

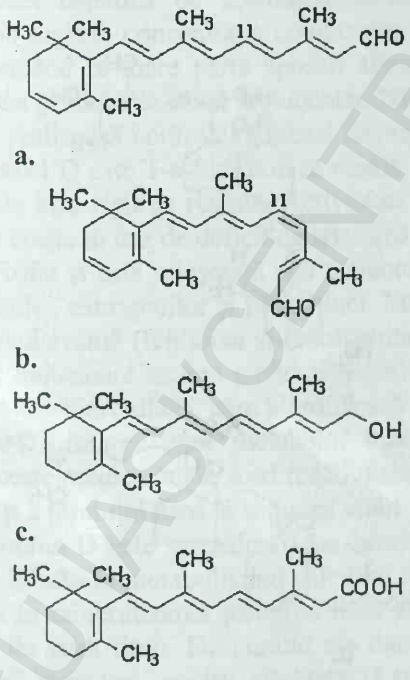


Figura 6.15. All-trans retinal (a), 11-cis-retinal (b), retinol (c), acid retinoic (d)

Vitamina A are proprietăţi anticanceroase, nu prin efect citostatic, ci prin stimularea transformării celulelor maligne în celule normale, prin diferenţiere. Efectul este atribuit intervenţiei reglatoare a retinoizilor în sinteza proteinelor şi glicoproteinelor. Acidul all-trans-retinoic este utilizat în tratamentul leucemiei acute promielocitare (M3), deoarece este capabil să inducă diferenţierea şi apoptoza celulelor leucemice şi să inhibe proliferarea celulelor blastice.

Vitamina A din organism are, de asemenea, un rol important în reproducere şi în dezvoltarea embrionară, în menţinerea unei permeabilităţi fiziologice a epiteliilor, în creşterea oaselor, favorizează procesele imune şi de apărare antiinfecţioasă, iar acidul retinoic are rol în sinteza glicoproteinelor (transportă prin membranele glicoproteo-lipidice oligozaharidele ce urmează a fi încorporate în glicoproteine).

Deficitul de vitamină A poate apărea datorită lipsei consumului de legume cu frunze verzi sau a altor surse de vitamină A. În afara carenţei alimentare, deficitul vitaminic se poate datora unor tulburări de absorbţie – în boala celiacă, fibroza chistică, colita ulceroasă, obstrucţia biliară, sprue, bypass intestinal etc. Ciroza hepatică tulbură procesul de depozitare la nivelul ficatului. În bolile infecţioase febrile sau în bolile renale se produce o scădere marcată a cantităţii de vitamină, ca urmare a eliminării crescute prin urină. Pacienţii supuşi alimentaţiei parenterale totale pot prezenta deficit de vitamina A, consecutiv distrugerii acesteia în lichidele perfuzate, datorită depozitării prelungite. În hipertiroidism şi în diabet, conversia carotenoizilor este deficitară. Utilizarea îndelungată a unor medicamente poate induce deficite nutriţionale, în special la vârstnici. Printre medicamentele care produc cel mai frecvent un dezechilibru al statusului vitaminei A se numără laxativele, care accelerează tranzitul intestinal şi scad absorbţia vitaminei, colestiramina şi colestipolul, care leagă vitamina şi, în anumite condiţii, neomicina şi colchicinele.

Cel mai precoce simptom este orbirea nocturnă, urmat de degenerescenţă retiniană. Mai pot apărea hemeralopie, xeroftalmie, keratomalacie, xeroză şi hiperkeratoză foliculară, scăderea durităţii dinţilor şi oaselor.

Metodele biochimice de evaluare a statusului vitaminei A includ determinarea concentraţiilor retinolului în sânge şi în laptele matern, testul relativ doză-răspuns şi testul de diluţie izotopică cu retinol deuterat.

Principala limitare a interpretării concentraţiei retinolului plasmatic este faptul că aceasta este controlată homeostatic şi nu scade decât atunci când rezervele hepatice de retinol sunt foarte mici. În plus, RBP, transportorul plasmatic al retinolului, este o proteină negativă de fază acută, a cărei concentraţie scade în timpul infecţiilor.

Concentraţia retinolului din laptele matern poate fi predictivă pentru statusul retinolului la sugarul alimentat natural. Mai precis, o concentraţie a retinolului în lapte la limita inferioară a normalului indică un risc crescut ca sugarul să dezvolte o carenţă de vitamină A.

Testul relativ doză-răspuns constă în administrarea unei doze mici de retinil ester şi recoltarea a două probe de sînge, la momentul iniţial şi la 5 ore după administrarea dozei, cu calcularea creşterii procentuale a concentraţiei retinolului plasmatic. Testul se bazează pe principiul că, în cazul depleţiei de vitamină A, apo-RBP se acumulează în ficat. După administrarea dozei test de retinil ester, retinolul se va lega de excesul de RBP şi va fi exportat în circulaţie sub formă de complex holo-RBP-retinol.

În prezent, evaluarea rezervelor hepatice de retinol este considerată „standardul de aur". Datorită îmbunătăţirii sensibilităţii spectrometrelor de masă, testul de diluţie izotopică cu retinol deuterat a fost utilizat cu succes în evaluarea rezervei totale de vitamină A din organism.

Supradozajul cronic cu retinol determină toxicitate manifestată prin prurit, vărsături, căderea părului, dureri osoase şi articulare, hiperostoză, hepatomegalie, splenomegalie, hipotiroidism, hipertensiune intracraniană benignă. Singura modificare paraclinică este creşterea concentraţiei vitaminei în ser, mai ales sub forma retinil-esterilor. Concentraţia RBP este normală, excesul de vitamină A fiind legat de lipoproteine. Pentru prevenirea toxicităţii se administrează concomitent vitamina C şi E cu rol antioxidant.

6.2.2 Vitamina D (calciferolii)

Există mai multe vitamere şi mai multe provitamine ale vitaminei D. Din provitamine, sub acţiunea razelor UV, rezultă vitaminele cu acţiune antirahitică.

Din punct de vedere al acţiunii, cele mai importante vitamere sunt:

- Vitamina D_2 (ergocalciferolul), care reprezintă sursa alimentară şi terapeutică de vitamina D;
- Vitamina D_3 (colecalciferolul), sintetizată la nivelul dermului, prin iradierea cu raze ultraviolete a precursorului său, 7-dehidrocolesterol. Se găseşte şi sub formă sintetică, utilizată ca sursă terapeutică de vitamina D.

Structural, vitaminele D sunt formate dintr-un nucleu steranic şi catenele laterale ale acestuia (*Figura 6.16*). Vitamina D_2 este solidă, cristalină, incoloră, se dizolvă în solvenţi organici, grăsimi, este stabilă la temperaturi înalte şi este relativ stabilă în mediu acid.

Necesarul este, în medie, de 400-500 UI/zi, variind în funcţie de ritmul de creştere, regimul de însorire şi de factori individuali, condiţionaţi genetic. Nevoile de vitamina D sunt crescute în timpul sarcinii şi alăptării. În condiţiile unei expuneri insuficiente la soare, este nevoie, de asemenea, de un aport exogen de vitamină.

Sursele alimentare sunt ficatul, uleiurile din ficatul de peşte, gălbenuşul de ou. Alimentele de origine vegetală sunt destul de sărace în vitamină. Laptele este o sursă foarte săracă în vitamina D. Laptele de vacă asigură 10-40 UI/L, mult sub necesarul vitaminic zilnic. Formulele de lapte pentru sugari sunt îmbogăţite cu vitamina D. Laptele uman, deşi conţine doar 15,7-50 UI/L vitamină D liposolubilă, are o acţiune antirahitică pronunţată. Acest fapt a fost explicat în urma de-

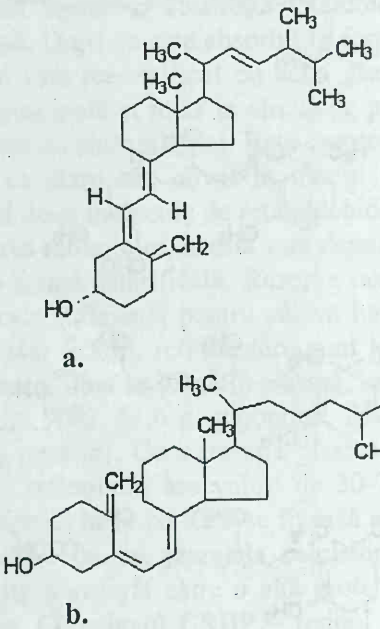


Figura 6.16. Structura vitaminelor D:
a. ergocalciferol (vitamina D_2), **b.** colecalciferol (vitamina D_3)

monstrării prezenţei în laptele matern a 850 UI/L sulfat hidrosolubil de vitamina D_1.

Calciferolii se absorb în porţiunea proximală a intestinului subţire, în prezenţa acizilor biliari. Disponibilitatea pentru absorbţie este superioară pentru colecalciferol. De aici, vitamina D este transportată la ficat legată de o α_2-globulină specifică. La nivel hepatic, sub acţiunea 25-hidroxilazei, are loc hidroxilarea ergo- sau colecalciferolului rezultând un metabolit activ, 25-hidroxicolecalciferolul. O parte din această formă ajunge şi în circuitul enterohepatic. În tubii renali are loc a doua hidroxilare, fie în poziţia 1, fie în poziţia 24, rezultând dihidroxicolecalciferolul. 1,25 dihidroxicolecalciferolul (calcitriolul) are o acţiune biologică de 100 de ori mai intensă decât a vitaminelor D_2 sau D_3. Actual, se consideră că derivatul 24,25-dihidroxilat al vitaminei D este inactiv.

Colecalciferolul poate fi produs şi în organism, la nivelul pielii, din 7-dehidrocalciferol, sub acţiunea razelor ultraviolete (296-310 nm) (*Figura 6.17*). Intensitatea acestui proces depinde de vârstă, pigmentarea constituţională, suprafaţa de tegument expusă, anotimp, latitudine. Razele ultraviolete nu pătrund prin sticla obişnuită a ferestrelor, iar pielea hiperpigmentată, ecranând ultravioletele, constituie un factor favorizant pentru apariţia deficitului vitaminic.

Sinteza hepatică de 25-hidroxicolecalciferol este slab reglată, concentraţia compusului în sânge reflectând în mare parte aportul alimentar şi cantitatea produsă la nivel tegumentar. Nivelul la care se realizează controlul sintezei formei active a vitaminei D este 1-α-hidroxilaza renală, a cărei activitate este riguros reglată. Activitatea acestei enzime creşte în caz de deficit de vitamină D, calciu şi fosfat şi este micşorată sub acţiunea parathormonului, estrogenilor şi prolactinei. Medicaţia anticonvulsivantă (fenitoina şi fenobarbitalul) are acţiune inductoare asupra enzimei hepatice citocrom P-450 hidroxilază, care hidrolizează calciferolul, cu formarea unor metaboliţi inactivi. În plus, aceste medicamente scad reactivitatea intestinului şi a ţesutului osos la acţiunea vitaminei D.

Vitamina D este considerată un hormon steroid, rolul său în metabolismul calciului şi fosforului şi în mineralizarea ţesutului osos fiind cunoscut de mult timp. De curând s-a demonstrat faptul că receptorii pentru vitamina D sunt prezenţi într-o mare varietate de celule, iar efectele sale biologice sunt mult mai extinse decât controlul metabolismului mineral. Forma activă a vitaminei D se leagă de receptori intracelulari care funcţionează apoi ca factori de transcripţie şi modulează expresia genică. Ca şi receptorii pentru alţi hormoni steroizi şi pentru hormoni tiroidieni, receptorul pentru vitamina D are un domeniu de legare a hormonului şi un domeniu de legare a ADN. Acesta din urmă constă în doi li-

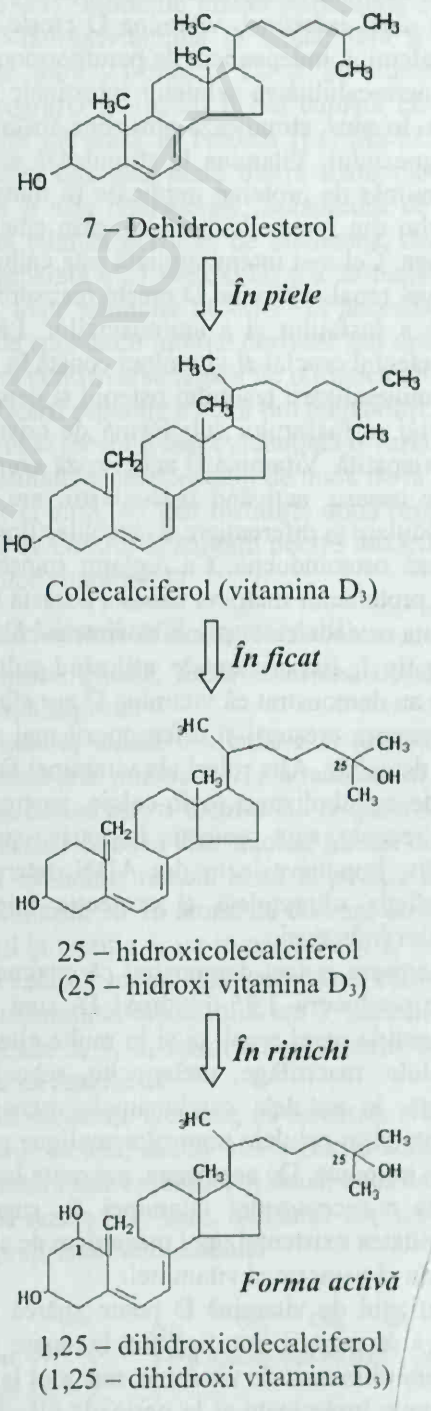


Figura 6.17. Formarea compuşilor activi ai vitaminei D

ganzi de zinc (*zinc fingers*) ce conţin secvenţe specifice recunoaşterii secvenţelor de ADN din genele ţintă. Receptorul vitaminei D formează un complex cu un alt receptor intracelular, mai precis cu receptorul retinoidului X, şi acest heterodimer se leagă de ADN. În cele mai multe cazuri, efectul este de activare a transcripţiei, dar există şi cazuri în care vitamina D suprimă transcripţia.

La nivel intestinal, vitamina D creşte absorbţia calciului, independent de parathormon, crescând permeabilitatea celulelor intestinale pentru calciu. În plus, stimulează absorbţia fosfaţilor şi a magneziului. Vitamina D stimulează expresia unui număr de proteine implicate în transportul calciului din lumenul intestinal, prin enterocite, în sânge. Cel mai intens studiată este calbindina. La nivel renal, vitamina D creşte reabsorbţia tubulară a fosfaţilor şi a aminoacizilor. La nivel osos, efectul crucial al vitaminei constă în stimularea mineralizării ţesutului osteoid şi depunerea calciului şi fosforului sub formă de cristale de hidroxiapatită. Vitamina D acţionează asupra celulelor osoase, activând osteoclaştii, are efecte de modulare şi diferenţiere a osteoblaştilor şi stimulează osteoinducţia. Ca reglator transcripţional al proteinelor matricei osoase, aceasta induce expresia osteocalcinei şi inhibă sinteza colagenului de tip I. Experimentele utilizând culturi de celule au demonstrat că vitamina D are efecte intense asupra creşterii şi diferenţierii mai multor tipuri de celule. Alte roluri ale vitaminei D, nelegate de metabolismul fosfo-calcic, susţinute de studii recente, sunt protecţia împotriva stresului oxidativ, împotriva leziunilor ADN determinate de radiaţia ultravioletă şi protecţia împotriva agenţilor infecţioşi.

Interesant, a fost demonstrat că enzimele necesare producerii 1,25-dihidroxi D_3 sunt active nu numai la nivel renal, ci şi în multe alte tipuri de celule: macrofage, melanocite, sebocite, în prostată, în celulele carcinoamelor scuamoase cutanate şi în celulele tumorilor maligne pulmonare şi colonice. De asemenea, prezenţa larg răspândită a receptorului vitaminei D, sugerează posibilitatea existenţei unui mecanism de acţiune autocrin şi paracrin al vitaminei.

Deficitul de vitamină D poate apărea ca urmare a expunerii insuficiente la soare şi/sau aportului diminuat de vitamină, mai ales la copii, la femeile însărcinate şi în perioada alăptării. O altă cauză de deficit este reprezentată de perturbarea absorbţiei digestive a vitaminei: la bolnavii cu afecţiuni hepatice, în caz de obstrucţie biliară şi în caz de steatoree. Colestiramina poate, de asemenea, interfera cu absorbţia colecalciferolului. Malabsorbţia intestinală întrerupe şi circulaţia enterohepatică a derivaţilor hidroxilaţi. Insuficienţa renală cronică perturbă activitatea hidroxilazelor renale care determină apariţia derivaţilor activi de vitamină D. În cazul acidozelor renale tubulare distale, o mare parte din carbonatul de calciu din os este utilizat ca tampon pentru neutralizarea acidozei metabolice rezultate din eliminarea excesivă a ionului bicarbonic la nivelul tubului renal distal. Au fost identificate un număr de defecte genetice care împiedică formarea derivaţilor dihidroxilaţi activi sau determină rezistenţa structurilor efectoare la acţiunea acestora. Activitatea 1-α-hidroxilazei renale scade cu înaintarea în vârstă, fapt ce contribuie la instalarea osteoporozei şi la creşterea riscului de fracturi osoase la vârstnici.

Carenţa determină scăderea absorbţiei calciului la nivel intestinal şi creşterea eliminării urinare a fosfatului, manifestată prin apariţia rahitismului la copil şi a osteomalaciei la adult. Tabloul clinic al rahitismului constă în deformarea oaselor lungi, îngroşarea sincondrozelor costale şi epifizare, dureri în membrele inferioare, mai ales la mers. La copiii cu vârsta de peste 3 luni, se observă craniotabes rahitic – înmuierea oaselor craniului, în special parieto-occipital. La nivelul toracelui se observă apariţia şanţului submamar Harrison, rezultat prin retracţia toracică la nivelul de inserţie a diafragmului. Membrele superioare prezintă îngroşări ale extremităţii distale a radiusului, descrise ca „brăţări rahitice", consecutiv dezvoltării ţesutului osteoid demineralizat. În rahitism, fagocitoza este diminuată, ceea ce duce la creşterea riscului de apariţie a infecţiilor. Majoritatea manifestărilor rahitismului se datorează hiperparatiroidismului reacţional instalat pentru a menţine calcemia la valori normale.

Biochimic, calcemia are valori normale sau puţin scăzute, datorită intervenţiei parathormonului, iar eliminarea urinară a calciului este practic inexistentă. Fosfatemia prezintă o scădere accentuată, de obicei sub 3 mg/dL, în schimb creşte clearance-ul renal al fosfaţilor. Fosfataza alcalină serică creşte dramatic, consecutiv activităţii intense a osteoblaştilor. Consecutiv scăderii cantităţii de vitamină D activă, se produce o creştere a pierderii de aminoacizi prin urină, manifestată prin hiperaminoacidurie.

Modificarea obiectivă care pledează sigur pentru diagnosticul de rahitism este scăderea 25-hidroxivitaminei D serice.

La sugar, valoarea normală a concentraţiei serice a acestui metabolit al vitaminei D, determinată prin metode radioimune, este de 17,5 ± 1,9 ng/mL. În rahitism, concentraţia sa scade sub 12 ng/mL.

În osteomalacie, defectul de calcificare a oaselor este difuz, boala dezvoltându-se mult mai lent şi având un caracter generalizat.

Profilaxia antenatală a rahitismului se face prin administrarea calciului şi vitaminei D la femeia gravidă, în special în ultimele luni de sarcină. Profilaxia postnatală se face, cel mai frecvent, prin administrarea orală a 400-800 UI/zi copilului, începând din ziua a şaptea de viaţă, până la vârsta de 18 luni.

Hipervitaminoza D apare iatrogen, prin administrarea unor doze mari de vitamina D. Toate preparatele de vitamină D sunt toxice în doze mari. Supradozarea provoacă mobilizarea calciului din oase, cu osteoporoză, creşterea calcemiei peste 10,5 mg/dL, a calciuriei peste 5 mg/kg/zi şi a fosfaturiei. Dacă administrarea excesivă de vitamină continuă, calciul mobilizat se poate depune în ţesuturile moi, cu apariţia calcificărilor cardiace, pulmonare şi renale, care pot deveni fatale. Simptomele clinice constau în oboseală, slăbiciune, cefalee, anorexie severă, vărsături, poliurie cu urină diluată, polidipsie. La copii se poate opri creşterea. Nou-născuţii din mame intoxicate cu vitamina D pot prezenta insuficienţă paratiroidiană, cu hipocalcemie şi convulsii.

O întrebare frecventă se referă la care metabolit al vitaminei D ar trebui analizat în sânge pentru evaluarea statusului acesteia. Timpul de înjumătăţire al vitaminei D este de 24 ore, ceea ce face concentraţia serică a acesteia să fie dependentă de ingestia alimentară şi de expunerea recentă la soare. Timpul de înjumătăţire al 1,25-dihidroxivitaminei D este de aproximativ 4 ore, ceea ce face ca dozarea acestui compus să aibă o semnificaţie clinică limitată. Determinarea concentraţiei serice a 25-hidroxivitaminei D este actual considerată ca fiind cea mai potrivită pentru evaluarea statusului vitaminei D, datorită timpului de înjumătăţire mare, de aproximativ 3 săptămâni. Prin urmare, nivelul de 25-hidroxivitamină D reflectă rezervele de vitamină D realizate atât prin expunere la ultraviolete, cât şi prin aport alimentar. În plus, producerea hepatică a metabolitului nefiind reglată în mod semnificativ, este dependentă în primul rând de cantitatea de substrat disponibilă.

În prezent, măsurarea concentraţiei serice a 25-hidroxivitaminei D poate fi realizată prin tehnici imune (RIA şi ELISA) sau prin metode fizice de detecţie directă (HPLC sau cromatografie în mediu lichid cuplată cu spectrometria de masă, LC/MS). Tehnicile imune disponibile cuantifică 25-hidroxivitamina D totală, fără a putea distinge între 25-hidroxi D_2 şi 25-hidroxi D_3. cromatografia în mediu lichid cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS) are acurateţea cea mai mare dintre toate metodele actuale şi este considerată „standardul de aur". Această tehnică permite, de asemenea, determinarea separată a 25-hidroxi D_2 şi a 25-hidroxi D_3. Totuşi, toate tehnicile LC-MS/MS necesită utilizarea de standarde interne derivate sau deuterate şi există controverse legate de utilitatea clinică a cuantificării separate a celor doi metaboliţi.

Întrucât recent a fost evidenţiată o variabilitate a rezultatelor inacceptabil de mare de la un laborator la altul, au fost instituite două programe externe de control al calităţii pentru dozările metaboliţilor vitaminei D.

6.2.3 Vitamina E (tocoferolii)

În limba greacă, *tokos* înseamnă naştere iar *pherein*, a suporta.

În natură, există 6 vitamere E (α,β,γ,δ,ε,ζ) care diferă prin poziţia 5, 7, 8 a radicalului metil. Cea mai activă este α-tocoferolul (*Figura 6.18*).

Structura de bază este tocolul, format dintr-un nucleu cromanic, radical metil în poziţia 2 şi un radical saturat cu 16 atomi de carbon, un radical hidroxil în poziţia 6, iar în poziţiile 5, 7, 8 există sau nu radicali metil, prin care diferă cei 6 tocoferoli naturali. α-tocoferolul are 3 radicali metil în poziţiile 5, 7, 8, restul au combinaţii de câte doi sau un rest metil.

Sunt substanţe uleioase, cu densitate crescută, insolubile în apă, stabile sub acţiunea aerului, la temperatură mare, lumină şi acizi; sunt descompuse de razele UV, baze, oxidanţi. Toţi tocoferolii au proprietăţi antioxidante.

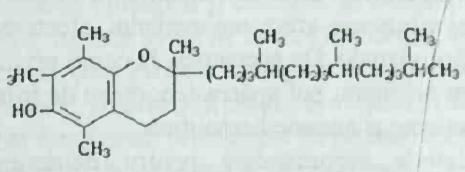


Figura 6.18. Structura α-tocoferolului

Sursele principale de vitamina E sunt reprezentate de germenii de bob de grâu, ulei, legume verzi, lapte, gălbenuş şi untura de peşte.

Aportul zilnic recomandat la adult este de 15 mg, fiind crescut când aportul de acizi polinesaturaţi este mare. Vitamina E este larg răspândită în alimente, iar necesarul zilnic este acoperit prin dietă. Laptele uman, spre deosebire de cel de vacă, conţine vitamina E în cantitate suficientă pentru a asigura un aport adecvat la sugari.

Metabolismul vitaminei E începe cu absorbţia din intestin; ca şi celelalte grăsimi (colesterol), este încorporată în chilomicroni, ajunge astfel în ficat şi în β-lipoproteinele plasmatice. Fosfolipidele din membranele mitocondriale şi din reticulul endoplasmatic au afinitate crescută pentru vitamina E, astfel încât aceasta se acumulează în membrane, depozitele asigurând protecţie împotriva carenţei timp îndelungat. Eliminarea din organism se face în principal prin bilă (trei sferturi), după oxidarea nucleului cromanic şi conjugarea cu acidul glucuronic, restul prin urină sub formă de glucuronide.

Rolul principal al vitaminei E este cel antioxidant, protejând unii constituenţi celulari importanţi împotriva oxidării, şi împiedicând formarea de produşi de oxidare agresivi pentru membranele celulare. Vitamina E protejează împotriva oxidării acizii graşi nesaturaţi, vitamina A şi carotenoizii, grupările tiolice ale unor enzime şi intervine probabil în funcţia ubiquinonelor (coenzima Q), coenzime mitocondriale importante pentru respiraţia celulară. Vitamina E joacă probabil un rol şi în reproducere, deoarece în stările de deficit apare o scădere a fertilităţii.

Vitamina E pare a avea un rol în imunomodulare: stimulează proliferarea limfocitară, scade producerea de prostaglandină E_2 care are efect imunosupresor şi diminuează nivelul peroxizilor lipidici plasmatici care au, de asemenea, un efect imunosupresor.

La om nu au fost dovedite cu certitudine stări de deficit de vitamina E. Mai frecvent, malabsorbţia lipidică poate duce la scăderea nivelului tuturor vitaminelor liposolubile, inclusiv al vitaminei E. Deficitul poate produce manifestări neurologice ca areflexie, scăderea sensibilităţii proprioceptive şi vibratorii, afectarea mersului, afectarea focalizării vizuale. De asemenea, la copiii prematuri hrăniţi artificial, pot apărea fenomene de iritabilitate, edeme şi anemie hemolitică.

Metoda recomandată pentru determinarea cantitativă a α-tocoferolului în ser este HPLC folosind pentru separare o coloană de fază normală şi un detector cu ultraviolete. Valorile de referinţă sunt mai mari de 0,70 μg/mL, iar în caz de deficit nivelul seric al vitaminei scade sub 0,5 μg/mL. Este important de reţinut faptul că vitamina E este transportată în sânge legată de lipoproteine, în special de LDL. Prin urmare, o creştere sau o scădere importantă a colesterolului seric va antrena o modificare corespunzătoare a nivelului de vitamină E. Prin urmare, nivelul plasmatic al vitaminei E trebuie interpretat în relaţie cu concentraţia colesterolului.

Testul de hemoliză a hematiilor, care măsoară stabilitatea membranei eritrocitare, oferă o evaluare excelentă a statusului vitaminei E. Se calculează raportul dintre nivelul hemolizei hematiilor spălate cu o soluţie de apă oxigenată şi cel al hemolizei hematiilor produse de apa distilată şi se exprimă procentual. Valorile de referinţă sunt mai mici de 10%, iar deficitul este caracterizat de un raport peste 20%.

Administrarea vitaminei E în doze mari la persoanele sănătoase produce rar fenomene de supradozaj. Adevărata intoxicaţie apare în două cazuri: la prematuri şi la persoanele care primesc tratament anticoagulant. Administrarea vitaminei E la prematuri a produs ascită, asociată cu hepatosplenomegalie, icter colestatic, trombocitopenie. În cantităţi mari, vitamina E poate antagoniza acţiunea vitaminei K şi prelungeşte timpul de protrombină, potenţând astfel efectul anticoagulantelor orale.

Deşi se credea că administrarea în doze mari a vitaminei E poate preveni apariţia cancerului sau a evenimentelor cardiovasculare majore, mai multe studii riguroase au demonstrat că această practică la pacienţi cu boli vasculare sau cu diabet zaharat nu numai că nu aduce nici un beneficiu, ci creşte chiar riscul apariţiei insuficienţei cardiace.

6.2.4 Vitamina K

Este numită şi vitamina antihemoragică, deoarece carenţa vitaminei K determină prelungirea timpilor de coagulare. Există mai multe vitamere: K_1 (fitomenadiona), K_2 (menachinonele), acidul fitocolic (prezent în peretele bacilului Koch) şi menadionele (produse de sinteză).

Structural, sunt formate dintr-un nucleu de p-naftochinonă substituit în poziţia 2 cu un radical metil şi în poziţia 3 cu un radical poliizoprenic care lipseşte în compuşii de sinteză.

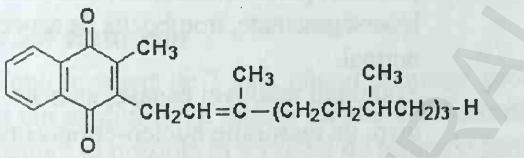
Proprietăţi fizice: vitamina K_1 este un lichid vâscos, galben, solubil în solvenţi organici, in-

stabil la lumină, se oxidează în aer, iar vitamina K_2 este solidă, sub forma unor cristale galbene.

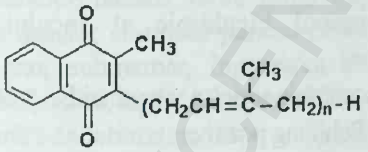
Sursele de vitamina K_1 mai importante sunt tărâţele de grâu, frunzele verzi ale unor plante. Vitamina K_2 este sintetizată de microorganisme, inclusiv de flora bacteriană intestinală a omului, se mai găseşte în uleiuri polinesaturate, ou, lapte, ficat. Necesarul este de aproximativ 120 μg/zi la bărbaţi şi 90 μg/zi la femei.

Din punct de vedere al metabolismului, fitomenadiona se absoarbe împreună cu grăsimile în jejun. Menachinonele se absorb din porţiunea terminală a intestinului subţire şi din colon, prin difuziune. Absorbţia vitaminelor K naturale, liposolubile, este dependentă de prezenţa sărurilor biliare, cele sintetice hidrosolubile trec direct în sânge. Vitaminele se depozitează în ficat realizând însă un depozit limitat, suficient doar pentru câteva săptămâni. Excesul este eliminat pe cale urinară, după glucuronoconjugare.

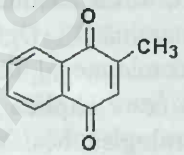
Vitaminele K acţionează la nivelul tuturor celulelor care produc proteine vitamino K dependente, în calitate de cofactor al γ glutamil carboxilazei microzomale care realizează γ-carboxilarea posttranslaţională a resturilor de acid glutamic de pe suprafaţa unor glicoproteine. γ carboxiglutamatul (Gla) este esenţial pentru stabilizarea srtucturii terţiare şi a funcţiei proteinelor care îl conţin. Printre acestea, factorii coagulării II (protrombina), VII (proconvertina), IX (factorul Christmas) şi X (factorul Stuart-Prower), sintetizaţi în ficat, osteocalcina (sintetizată în ţesutul osos) şi MGP matrix Gla protein sintetizată în ţesutul extrahepatic în special în cartilagii şi peretele arterial. Aceste resturi de acid di-γ-carboxiglutamic (Gla) leagă calciul, care ancorează proteinele de suprafeţele fosfolipidice încărcate negativ ale membranelor celulelor endoteliale şi ale plachetelor şi astfel le conferă activitate biologică. În cadrul reacţiei de carboxilare, vitaminele K se oxidează la epoxidul corespunzător. Revenirea vitaminei K la forma redusă, activă, se face sub acţiunea unei reductaze. Anticoagulantele orale, precum warfarina şi dicumarolul, blochează reducerea vitaminei K oxidate la forma redusă, întrerupând astfel ciclul de acţiune al vitaminei.



a.



b.



c.

Figura 6.19. Structura vitaminelor K: **a.** vitamina K_1; **b.** Vitamina K_2 (n = 6, 7 sau 9 resturi izoprenice); **c.** Vitamina K_3 (menadionă sintetică)

Carenţa de vitamina K poate surveni în asociere cu afecţiuni care perturbă absorbţia lipidelor – icterul mecanic şi fistula biliară scad cantitatea de bilă din intestin, rezecţia intestinală întinsă şi sprue determină sindroame de malabsorbţie. În plus, tratamentul prelungit cu antibiotice cu spectru larg poate suprima temporar flora intestinală şi, prin scăderea producţiei de vitamina K, poate conduce la o stare de deficit în condiţiile lipsei suplimentării vitaminice. Supradozarea anticoagulantelor orale, care au acţiune antivitaminică K, a salicilaţilor, care scad protrombinemia şi a vitaminei A, care inhibă formarea vitaminei K_2 de către flora intestinală, poate provoca, de asemenea, manifestări ale deficitului vitaminic K. Carenţa de vitamină K sau inhibarea reductazei prin tratamentul de durată cu anticoagulante orale diminuează fixarea eficientă a calciului în ţesutul osos de către (MGP) osteocalcină. La nounăscuţi, carenţa este mult mai frecventă datorită florei intestinale neformate şi faptului că vitamina K străbate greu placenta, necesitând administrarea fitomenadionei la naştere pentru a preveni apariţia bolii hemoragice a nou-născutului.

Concentraţia vitaminei K poate fi determinată prin metode biologice şi chimice. În determinările chimice, trebuie avută în vedere fotosensibilitatea vitaminei, deci probele biologice trebuie păstrate la întuneric. În practică, status-ul vitaminei K este evaluat funcţional, prin testele de protrombină.

Deficitul de vitamină K se manifestă prin prelungirea timpilor de coagulare, cu apariţia de he-

moragii cutanate şi mucoase, mergând, în cazuri severe, până la hemoragii fatale.

În tratamentul deficitului vitaminic, trebuie ţinut cont de faptul că procesul de carboxilare a proteinelor osoase necesită cantităţi mai mari de vitamină K decât carboxilarea proteinelor la nivel hepatic. Prin urmare, administrarea vitaminei K poate corecta anomaliile de coagulare datorate carenţei vitaminice, dar metabolismul osos rămâne compromis pe perioadă mai îndelungată.

Administrarea în exces a vitaminei naturale determină depunerea fără toxicitate, în timp ce cea a vitaminei sintetice determină albuminurie, eritem, porfirinurie. Utilizarea menadionei trebuie evitată la nou-născuţi, şi la sugari, în special la prematuri, deoarece, în doze uzuale poate produce anemie hemolitică, hiperbilirubinemie şi favorizează apariţia icterului nuclear. Creşterea bilirubinei este explicată prin competiţia între menadionă şi pigmenţii biliari pentru procesul de glucuronoconjugare, a cărui capacitate este limitată în primele luni de viaţă. Hemoliza este favorizată de deficitul hematiilor în glucozo-6-fosfat dehidrogenază.

6.3 Prezentări de caz

6.3.1 Deficit de tiamină

Pacient în vârstă de 40 ani, sex masculin, cunoscut alcoolic, se prezintă în serviciul de urgenţă cu dispnee, confuzie, edeme la nivelul membrelor inferioare. Anamneza relevă o alimentaţie dezechilibrată, bazată în special pe hrană conservată.

Examenul clinic: tahicardie, dispnee, distensia venelor jugulare, cardiomegalie, hepatomegalie, edeme gambiere bilaterale, confuzie, nistagmus, reflexe osteo-tendinoase diminuate, dificultăţi de mers. Examenul radiologic: cardiomegalie, congestie pulmonară bazală bilaterală.

Date de laborator:

- testul transcetolazei eritrocitare:
  - fără TPP adăugat: 1,8 µmol/h/10^9 hematii
  - după adăugare de TPP: 2,5 µmol/h/10^9 hematii.
- concentraţia serică a piruvatului: 0,87 mg/dL (valori normale: 0,36-0,59 mg/dL).
- eliminarea urinară a tiaminei: 10 µg/24 h.

Comentariu

Diagnosticul este de deficit sever de tiamină. Activitatea transcetolazei eritrocitare a crescut cu aproximativ 38% după adăugarea de TPP în mediul de reacţie, ceea ce denotă o scădere marcată a saturării enzimei cu coenzima sa, fenomen care este un indicator clar al deficitului de tiamină. Eliminarea urinară scăzută a tiaminei susţine diagnosticul. Insuficienţa cardiacă şi prezenţa edemelor sunt, în acest caz, caracteristice pentru boala beri-beri „umed". Piruvatul este crescut în circulaţie, datorită scăderii activităţii piruvat dehidrogenazei, enzimă dependentă de TPP, care asigură transformarea piruvatului în acetil-coenzimă A.

6.3.2 Deficit de vitamină B_{12}

Pacient în vârstă de 70 ani, prezintă, de aproximativ 3 luni, astenie, ameţeală, greaţă şi vărsături ocazionale, scădere ponderală, dispnee şi parestezii la nivelul extremităţilor.

Examenul clinic: icter scleral moderat, limbă roşie, depapilată, cu aspect lăcuit, pierderea echilibrului şi a sensibilităţii vibratorii la nivelul membrelor inferioare.

Date de laborator:

- hiperbilirubinemie indirectă (2,5 mg/dL),
- examen hematologic:
  - hemograma automată: Hb = 9 g/dL, Ht = 37%, VEM = 118 fl, CHEM = 36 g/dL.
  - frotiul de sânge periferic: normocromie, macrocitoză, ovalocitoză, megalocite prezente, polimorfonucleare neutrofile hipersegmentate, trombocite de aspect normal.
  - examenul măduvei osoase: asincronism de maturaţie nucleo-citoplasmatică prezent la toate seriile; prezenţi megaloblaşti, metamielocite gigante, megakariocite mari, cu nucleu polilobat.
- examenul biochimic al sucului gastric: aclorhidrie,
- concentraţia serică a vitaminei B_{12} = 80 pg/mL,
- test Schilling pozitiv,
- concentraţia serică a acidului folic: 16 ng/mL.

Comentariu

Diagnosticul este de anemie megaloblastică prin deficit de vitamină B_{12}. Deficitul de vitamină B_{12} produce anemie megaloblastică şi afectare gastro-intestinală (care explică greaţa, anorexia şi glosita) şi neurologică. Manifestările neurologice sunt cele mai grave şi includ demielinizare şi degenerare axonală, implicând nervii periferici şi cordoanele posterioare şi laterale ale măduvei spinării. Aceste fenomene explică tulburările neurologice la acest pacient.

6.3.3 Deficit de vitamina C (scorbut)

Un sugar în vârstă de 6 luni a fost adus la spital de către mama sa. Copilul nu îşi mişca mâinile şi picioarele şi plângea dacă era atins. În ultimele 10 zile, copilul a prezentat scăderea apetitului şi a tonusului muscular. Mama a relatat că alimentaţia copilului nu era încă diversificată şi consta în formule de lapte, fără sucuri de fructe. Ea a accentuat faptul că obişnuia să fiarbă laptele praf după reconstituire, pentru a se asigura că este steril. Copilul se născuse la termen şi nu prezentase alte semne de boală. La examenul obiectiv, se puteau observa numeroase tumefieri şi peteşii pe suprafaţa corpului.

Comentariu

Copilul suferea de scorbut. Vitamina C prezentă în formula de lapte era distrusă în timpul fierberii şi, în condiţiile lipsei din alimentaţie a sucurilor de fructe sau a administrării unui supliment de acid ascorbic, sugarul a dezvoltat o stare carenţială avansată. Vitamina C este necesară în calitate de cofactor pentru prolin şi lizin hidroxilaze, implicate în sinteza colagenului. În scorbut, datorită lipsei hidroxilării prolinei şi lizinei, nu se mai produce stabilizarea triplului helix de colagen prin legături de hidrogen. Prin urmare, fibrele de colagen sunt mai compacte decât în mod normal.

6.3.4 Rahitism

Copil în vârstă de 7 luni, născut prematur, provenit din mediul rural, dintr-o familie defavorizată economic, se prezintă în serviciul de pediatrie pentru semne de infecţie acută a tractului respirator superior. La examenul clinic se observă: faringe hiperemic, obstrucţie nazală, febră (38,5°C), dispnee, înmuierea oaselor craniului parieto-occipital, bose frontale, şanţ submamar, îngroşarea extremităţii distale a radiusului, hipotonie musculară.

Explorări de laborator:

- calcemie: 9 mg/dL
- fosfatemie: 2 mg/dL
- fosfataza alcalină serică: 350 UI/dL
- fosfaturie: 1,7 g/24h.

Examen radiologic: aspect franjurat la limita diafizo-epifizară, zone lăţite şi deformate „în cupă" la nivelul cartilajelor de creştere, demineralizare marcată a epifizelor.

Comentariu

Diagnosticul: rahitism prin deficit de vitamină D; faringită acută. În deficitul de vitamină D apare un hiperparatiroidism reacţional care menţine calcemia la valori nemodificate, scade fosfatemia şi creşte fosfaturia. Fosfataza alcalină serică este crescută datorită creşterii activităţii osteoblaştilor. În rahitism apare o creştere a susceptibilităţii la infecţii.

6.3.5 Deficit de vitamina K

O femeie în vârstă de 81 ani a fost adusă în serviciul de urgenţă pentru palpitaţii şi senzaţie de slăbiciune. Pacienta relata că nu urma nici un tratament medicamentos. Examenul obiectiv a evidenţiat o stare avansată de malnutriţie şi deshidratare. Examenul cardiologic indica o uşoară tahicardie, fără modificări de ischemie pe EKG.

Explorări de laborator:

- proteine totale serice = 6,2 g/dL
- glicemia = 72 mg/dL
- ASAT = 24 U/L
- ALAT = 28 U/L
- γGT = 35 U/L
- INR = 1,7
- testul pentru hemoragii oculte efectuat dintr-o probă de scaun a fost pozitiv.

Pacienta a primit o doză de vitamina K pe cale injectabilă, care i-a corectat timpul de protrombină în 3 zile.

Comentariu

Nutriţia deficitară, lipsa administrării altor medicamente, prezenţa sângerării oculte în scaun, timpul de protrombină prelungit şi testele hepatice normale pledează pentru deficitul de vitamină K. În lipsa vitaminei K, mai mulţi factori ai coagulării (protrombina, factorii VII, IX şi X) nu suferă modificarea post-translaţională de carboxilare a resturilor de glutamat sub acţiunea γ–glutamil carboxilazei, în hepatocit. După administrarea vitaminei K, metabolismul factorilor coagulării revine la normal, iar timpul de protrombină este corectat.

Bibliografie selectivă

1. Berdanier CD, Dwyer J, Beldman EB. Handbook of nutrition and food. 2nd ed. CRC Press; 2008.
2. Fischl FH. Menopause, Andropause. Hormone replacement therapy through the ages. New cognition and therapy concepts; Krause & Pachernegg Gmbh, Wien
3. Hollis BW. Assessment of vitamin D status and definition of a normal circulating range

of 25-hydroxyvitamin D. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2008 Dec ;15(6):489-494.
4. Howanitz J, Howanitz P. *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991.
5. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition. 16th ed. McGraw-Hill Professional; 2004.
6. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JMO, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. JAMA. 2005 Mar 16;293(11):1338-1347.
7. McColl KEL. Effect of Proton Pump Inhibitors on Vitamins and Iron. Am J Gastroenterol. 2009 ;104(S2):S5-S9.
8. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. Exp. Dermatol. 2007 Jul ;16(7):618-625.
9. Sanders T, Emery P. Molecular basis of human nutrition. New York: Taylor & Francis; 2003.
10. Stroescu V. Bazele farmacologice ale practicii medicale. Ed. a VII-a, Editura Medicală, 2001
11. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. Am. J. Clin. Nutr. 2008 Apr; 87(4): 1087S-91S.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 7.
Metabolismul carbohidraților

Minodora Dobreanu

Glucidele (hidrații de carbon) sunt polialcooli monomerici (oze) sau polimerizați (polioze), având și o funcție aldehidică sau cetonică, ceea ce face posibilă formarea unui număr însemnat de derivați substituiți (acetilați, aminați, fosforilați, sulfatați), reduși sau oxidați. Din cauza prezenței atomilor de carbon asimetrici în moleculele lor, glucidele au numeroși izomeri optici, care se deosebesc între ei și în privința activităților lor biologice. Aceşti izomeri pot fi deosebiți în funcție de sensul de rotire al planului de vibrație al luminii polarizate: spre dreapta (D) dextrogire sau stânga (L) levogire.

În soluții apoase, monozaharidele formează câte o legătură semiacetalică (derivat aldehidic) între gruparea carbonilică (aldehidică sau cetonică) și gruparea hidroxilică (alcoolică) cea mai apropiată. Astfel, pe de o parte apare un nou atom de carbon asimetric în moleculă, care duce la dublarea numărului izomerilor activi optic posibili, iar pe de altă parte se formează o structură heterociclică pentagonală (furanoidă: furanoza) sau hexagonală (piranoidă: piranoza), conținând și un atom de oxigen.

Hidroxilul din gruparea carbonilică semiacetalică (carbonul 1 - C_1) este deosebit de reactiv și poate forma ușor legături glucozidice, cu gruparea hidroxilică de la atomul de carbon 4 (C_4); astfel se formează dizaharide, iar prin repetarea reacției de glicozilare - a oligo- (tri-, tetra-, penta-, hexa-, heptoze) și polizaharide (polioze: glicogenul, amidonul, celuloza). Monozaharidele (aldozele și cetozele) cele mai importante sunt: trioze - gliceinaldehida și dioxiacetona; pentoze - riboza și ribuloza; hexoze - glucoza, manoza, galactoza și fructoza, precum și heptoze - sedoheptuloza.

Monozaharidele din structura catenelor longitudinale ale poliozelor sunt cuplate între ele prin legături glucidice între C_1 și C_4, iar cele de la nivelul ramificațiilor, între C_1 și C_6. Orientarea în spațiu a acestor legături este determinată de izomeria optică manifestată la nivelul carbonilului semiacetalic: α sau β. Dizaharidele mai importante sunt: maltoza (α glucozil-1,4–α glucoza), zaharoza (α glucozil-1,2 - β fructoza) și lactoza (β galactozil-1,4–α glucoza). Polizaharidele vegetale cele mai importante pentru om sunt: amidonul (poli α–1,4 și α–1,6 D-glucoza) și celuloza (poli β–1,4 D-glucoza); cel de origine animală este glicogenul (poli α–1,4 și α–1,6 D-glucoza). Celuloza are o structură longitudinală foarte solidă și rezistentă; în structura amidonului și a glicogenului, lanțurile glucidice cuplate prin legături C_1 - C_4, sunt răsucite sub formă de spirale hexagonale, cu un număr variabil de ramificații la nivelul atomilor de carbon C_1 - C_6. *Figura 7.1* prezintă schema structurală și formula chimică a glicogenului.

Carbohidrații sunt larg răspândiți în lumea vie, îndeplinind importante funcții metabolice, dar și structurale.

Glucidele au un rol energetic important: 1 g glucoză furnizează prin descompunere în organism 4,1 kilocalorii. Rezervele glucidice se acumulează în formă polimerizată: în plante sub formă de amidon (dar și de celuloză), iar în celulele animale sub formă de glicogen. Capacitatea de rezervă energetică a glicogenului în organism, în comparație cu cea a grăsimilor, este totuși limitată, mai ales din cauza hidrofiliei sale (fixează o mare cantitate de apă).

Elemente structurale, sub forma glucozaminoglicanilor (mucopolizaharidelor) alcătuiesc substanța fundamentală a diferitelor țesuturi și organe, în frunte cu țesutul conjunctiv, cartilaginos și osos. Ele sunt polimerii hexozaminelor, ai acidului hialuronic, ai sulfaților de condroitină, ai dermatan- și heparan-sulfaților. Sub forma unui mediu microporos ordonat, substanța fundamentală acționează și ca moderatorul schimburilor hidrice și osmotice, între lichidele biologice și celule. Distrugerea enzimatică (prin hialuronidază, *spreading factor* – factor de invazie) a acestei bariere microporoase formate de acidul hialuronic, duce la înlesnirea pătrunderii microbilor, dar și a difuziunii lichidului interstițial. Polizaharidele sunt elemente structurale ale peretelui celular bacterian sau vegetal.

Glicoproteinele conțin lanțuri glucidice fixate de anumiți aminoacizi (ac. aspartic, glutamic, serina și oxiprolina) din structura peptidelor. În cazul glicoproteinelor de tip mucinic, întreaga suprafață a proteinei vehiculante este acoperită de polimeri glucidici. Astfel, acești polimeri funcționează ca lubrifianți în secreții glandulare mucinoase. Glicoproteinele de tip seric conțin catene laterale glucidice cuplate numai la nivelul unor aminoacizi restrânși. Prezența acestor catene laterale, pe de o parte contribuie la determinarea specificității biologice a moleculelor proteinice respective, iar pe de alta parte și la stabilizarea lor, atât pe plan fizico-chimic cât și biologic, prin creșterea rezistenței lor față de proteoliză.

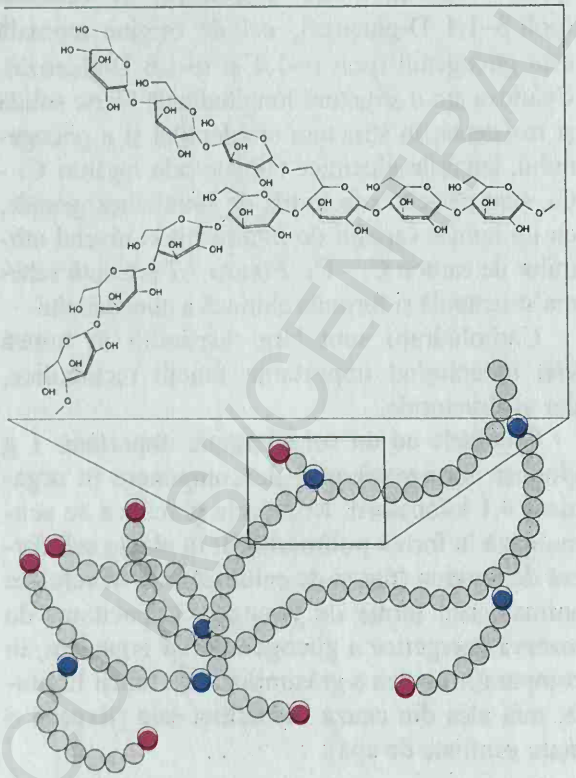


Figura 7.1. Schema structurală a glicogenului și structura chimică a poli α-D-glucozei

Carbohidrații sunt elemente structurale de bază în diverse molecule biologic active: acizi nucleici, coenzime nucleotidice, glicolipide și furnizori de compuși intermediari, esențiali pentru biosinteza sau interconversiunea unor serii întregi de substanțe și coenzime (NADH, NADPH), pentru metabolismul lipidic (dioxiaceton fostatul, acetatul activat), protidic (piruvatul pentru formarea aminoacizilor neesențiali), nucleoproteinic (riboza, dezoxiriboza) etc. A devenit clar că spre deosebire de concepția anterioară, rolul metabolic complex al glucidelor este mult superior rolului lor energetic.

Glucidele determină specificitatea biologică a moleculelor proteice la care se atașează:

a. Se găsesc în structura antigenelor specifice de grupă sanguină din sistemul ABO (Landsteiner). Acest sistem constă în existența pe suprafața hematiilor, plachetelor, spermatozoizilor, endoteliului și a multor celule epiteliale a unor antigene: AB-H (aglutinogene). În plasmă, respectiv în lichidele biologice, aceste antigene determină apariția unor anticorpi naturali (aglutinine) care aglutinează hematiile la contactul cu antigenul complementar.

Antigenele sunt formate dintr-un suport proteic (sau lipidic) și haptena (determinantul antigenic) alcătuit dintr-un oligozaharid cu patru tipuri de monozaharide: L-fucoza, D-galactoza, N-acetil-galactozamina (NAGal-NH_2) și N-acetil-glucozamina (NAGlu-NH_2).

Biosinteza determinanților antigenici este controlată genetic prin biosinteza unor enzime (glicozil-transferaze). Structura de bază este alcătuită din Gal-NAGluNH_2-Gal-NAGalNH_2. Gena H codifică αL-fucozil transferaza, care atașează fucoza de structura de bază amintită, formând astfel antigenul specific H (grupa 0). La substratul H se atașează NAGal-NH_2 sub acțiunea α NAGalNH_2-transferazei codificate de gena A, formând astfel antigenul specific A. Din substratul H prin adăugarea unui rest de galactoză - sub acțiunea galactoz-transferazei codificată de gena B - se formează antigenul specific B.

Pentru explicarea distribuției grupelor sanguine există două posibilități ipotetice:

1. toți oamenii aparțineau inițial grupei 0 (specific antigen H) și prin mutații câștigă capacitatea de biosinteză a determinanților de grupă A și/sau B.

2. toți oamenii posedau inițial determinanți antigenici de grupă A și B, iar printr-o mutație adaptativă pierd capacitatea de biosinteză a uneia sau ambilor determinanți de grupă sanguină A, B, rămânând grupa 0 (antigen H). În mod speculativ se atribuie epidemiilor de ciumă un rol în geneza acestor mutații.

b. Carbohidrații ajută la formarea determinanților complexului de histocompatibilitate HLA, a receptorilor hormonali, virali etc.

c. Toate proteinele plasmatice (mai puțin albumina, α amilaza, β–2 microglobulina și proteina C reactivă) sunt glicoproteine: imunoglobulinele, factorii de coagulare, antiproteazele, sistemul complement etc.

7.1 Sursele de carbohidrați

Sursele carbohidraților în organismele vii sunt de natură vegetală sau animală: plantele sintetizează carbohidrați prin fotosinteză, folosind energia solară, CO_2 și apă; organismele animale pot sintetiza unii carbohidrați din substrate relativ simple (de exemplu glicerolul, lactatul, aminoacizii etc).

Glucoza este principala formă sub care sunt absorbiți, utilizați, dar și depozitați carbohidrații în organismele vii.

Glicemia fiziologică la om oscilează în intervalul 70-99 mg/dL, rareori scăzând sub 45 mg/dL sau depășind 140 mg/dL. Acest parametru sanguin depinde de rata de intrare în circulație a glucozei, respectiv de utilizarea acesteia de către celulele consumatoare. Glucoza sanguină poate avea diferite origini:

a) Din alimentație – în urma proceselor de digestie și absorbție intestinală;

b) Din depozitul temporar hepatic - prin glicogenoliză/- glicogenogeneză;

c) Din gluconeogeneza hepatică - din lactoză, alanină, glicerol.

Ficatul este organul central în asigurarea homeostaziei glucozei.

7.1.1 Glucoza de origine alimentară

Prin alimentația normală ajung zilnic în tubul digestiv aproximativ 350-500 g glucide, sub formă de polizaharide (amidon, glicogen), dizaharide (zaharoză, maltoză, lactoză) și monozaharide (glucoză, fructoză, manoză, pentoze). Deși digestia polizaharidelor începe încă în cavitatea bucală sub acțiunea α amilazei salivare (ptialinei), acțiunea acesteia este neînsemnată (timpul de contact al alimentelor cu saliva este relativ scurt), deoarece în mediul acid al sucului gastric amilaza se inactivează rapid. Digestia poliozelor se desfășoară deci în intestinul subțire (*Figura 7.2*). Alfa amilaza din sucul pancreatic descompune în mediu alcalin legăturile α-glucozidice (- 1, 4 -) din lanțurile longitudinale ale amidonului și glicogenului ingerat, cu eliberarea unor polimeri de hexoze cu grad de polimerizare mai mic (dextrine), iar sub acțiunea dextrinazelor rezultă maltotrioză, maltoză și izomaltoză. Legăturile glucozidice de la nivelul ramificațiilor (- 1, 6 -) sunt hidrolizate de enzima de deramificare (izomaltaza). Oligozaharidele, inclusiv dizaharidele (zaharoza, maltoza), conținând legături glucozidice, sunt descompuse în monozaharide de α-glucozidaze, iar cele cu legături β–glucozidice (lactoza), sunt hidrolizate de β-glucozidaze. La bolnavii cu intoleranța la lactoză această enzimă lipsește din sucul intestinal.

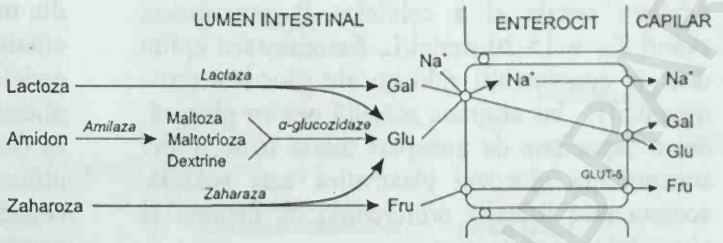


Figura 7.2. Digestia și absorbția glucidelor alimentare

Absorbția intestinală are loc sub forma monozaharidelor α-D glucoză, β-D fructoză și β-D galactoză. Mecanismul absorbției fructozei are loc prin difuziune facilitată (Na^+-independentă), glucoza și galactoza se absorb activ, prin co-transport Na^+-monozaharid (simport).

Transportorii monozaharidelor prin membranele celulare sunt proteine mebranare denumite GLUT 1 → 11, având 500 aminoacizi și 12 segmente transmembranare:

1. GLUT 1 se găsesc în țesuturile fetale, în membranele hematiilor, ale endoteliului bariei hemato-encefalice; deoarece au $K_M \approx 1$ mmol/L, sunt responsabile de preluarea bazală a glucozei (chiar la concentrații plasmatice mici ale glucozei asigură „respirația" celulară, datorită afinității foarte bune pentru glucoză).

2. GLUT 2 este transportorul specific al glucozei în membrana hepatocitului, celulelor

tubulare renale şi a celulelor β pancreatice; având K_M = 15-20 mmol/L, funcționează optim doar la concentrații ridicate ale glucozei (postprandial) – au afinitate scăzută pentru glucoză, dar o capacitate de transport foarte mare. Când concentrația glucozei plasmatice este scăzută, aceasta este folosită preferențial de neuroni şi alte celule extrahepatice.

3. GLUT 3 se găsesc în special în placentă şi în membranele neuronilor; au $K_M \approx 1$ mmol/L, fiind responsabile de preluarea bazală a glucozei (chiar la concentrații plasmatice mici ale glucozei).

4. GLUT 4 este transportorul specific în membrana celulelor musculare striate şi miocardice, fibroblaştilor şi adipocitelor, cu K_M = 5 mmol/L; numărul transportorilor activi GLUT 4 este direct influențat de insulină.

5. GLUT 5 se găseşte în membrana bazală (contraluminală) a enterocitelor şi lucrează în tandem cu transportorul de fructoză din membrana luminală.

6. Funcția izoformelor GLUT 6-11 nu este clar definită încă, GLUT 6, 8, 10, 11 par însă mai degrabă implicate în retenția intracelulară a glucozei.

Deversate în vena portă, monozaharidele ajung într-o primă etapă în ficat şi străbat membrana hepatocitului. Postprandial, când creşte concentrația glucozei sanguine, sunt activi (optim) toți transportorii membranari ai glucozei, inclusiv aceia cu K_M = 15-20 mmol/L, astfel surplusul de glucoză se depozitează sub formă de glicogen în ficat. Interconversiunea manozei în glucoză se realizează în mod spontan, printr-o simplă epimerizare. În schimb, transformarea galactozei în glucoză se realizează prin intermediul enzimei galactozil-1-P-uridil-transferaza. Lipsa ereditară a acestei enzime duce la acumularea galactozei intrahepatic, dar şi în globul ocular şi în sistemul nervos central. Transformarea reductivă a acesteia în polialcoolul numit galacticol, cu o toxicitate marcată produce grave leziuni locale. Prin depistarea din timp a anomaliei şi prin scoaterea lactozei (a laptelui şi a produselor lactate) din alimentația sugarului, poate fi prevenită apariția manifestărilor hepatice, oculare şi nervoase grave.

7.1.2 Glicogenogeneza-Glicogenoliza

Glicogenul (Gn) este o formă polimerizată de stocare a glucozei, cu o masă moleculară mare, uşor (rapid) mobilizabilă la nevoie. Structura sa ramificată este similară cu cea a amilopectinei. Ficatul poate depozita glicogen până la 7-10% din masa sa (maximum 150 g), acesta fiind principala sursă pentru menținerea glicemiei în perioadele interprandiale. Muşchiul poate depozita glicogen doar în proporție de 0,7-1,2% din masa sa (în total aproximativ 300-400g), acesta fiind utilizat pe plan local, pentru sinteză de ATP. Glicogenul hepatic prezintă variații circadiene: este maxim după masa de seară şi minim înainte de micul dejun: după 14-16 ore de privare alimentară, depozitele hepatice de glicogen se epuizează. În timpul somnului nocturn (de mai lungă durată) sursa menținerii glicemiei virează dinspre glicogenoliză spre gluconeogeneză - proces esențial pentru menținerea glicemiei în perioadele prelungite de înfometare.

7.1.2.1 Aspecte particulare ale metabolismului glicogenului

1. De ce se stochează glucoza în formă polimerizată şi nu rămâne în forma simplă?

Glucoza este osmotic activă. O celulă hepatică poate stoca aproximativ 400 mmol/L de glucoză, dar numai în formă polimerizată. Masa moleculară a glicogenului este în jur de 10^7 D, astfel încât concentrațiile rezultate nu crează probleme osmotice pentru celulă.

2. De ce glicogenul are o structură ramificată?

Este necesar ca glicogenul să fie ramificat (tip "amilopectinic") deoarece în forma aceasta are un singur capăt reducător (-OH glicozidic C_1) şi o mulțime de "capete" nereducătoare (-OH neglicozidice C_4) care sunt de fapt locul de acțiune al Gn fosforilazei şi Gn sintazei.

Dacă structura glicogenului ar fi de tip "amiloză" (neramificată) cu un singur capăt C_1 şi unul C_4, descompunerea şi sinteza glicogenului ar fi foarte lente.

3. De ce nu se stochează excesul energetic determinat de glucoză doar sub forma lipidelor?

Lipidele reprezintă cea mai eficientă modalitate de stocare a energiei în organism, dar au câteva inconveniente din punct de vedere energetic: lipidele nu eliberează energia atât de rapid ca glicogenul, nu pot fi utilizate în anaerobioză şi nu pot fi convertite eficient în glucoză, care este combustibilul preferențial pentru unele țesuturi (de exemplu, celula nervoasă şi hematia).

În organism, glucoza intră în căi metabolice multiple. În hepatocite şi în fibrele musculare (mai modest în alte celule), glucoza activată (transformată în uridil-difosfat-glucoză = UDP-G), se depozitează sub formă de glicogen, printr-

o secvență de reacții, numită glicogenogeneză. Glicogen-sintaza formează legături α–glucozidice (-1,4-) între moleculele de glucoză și terminațiile C_4 ale lanțurilor ramificate ale glicogenului. Ramificațiile (-1,6-) se produc sub acțiunea enzimei de ramificare.

7.1.2.2 Glicogenogeneza

Are loc predominent la nivel hepatic sau muscular, imediat postprandial când concentrația glucozei sanguine crește foarte mult. GLUT4 transportă glucoza în miocit, iar GLUT 2 în interiorul hepatocitului, hexokinaza și glucokinaza fosforilează glucoza, menținând-o astfel în interiorul celulei (fosforilarea moleculei de glucoză modifică major solubilitatea acesteia în membranele celulare, în sensul scăderii acesteia):

1. $G + ATP \xrightarrow{HK/GK} G\text{-}6\text{-}P + ADP$;
2. $G\text{-}6\text{-}P \xrightarrow{PG\text{-}mutaza} G\text{-}1\text{-}P$;
3. $G\text{-}1\text{-}P + UTP \xrightarrow{G\text{-}1\text{-}P\ uridil\ transferaza} UDP\text{-}G + +PPi$;
4. $G_n + UDP\text{-}G \xrightarrow{Glicogen\ sintaza} G_{n+1} + UDP$.

Glicogen sintaza necesită un primer pentru a-și începe activitatea (glucoza este o moleculă simplă, care nu poate funcționa ca primer). Glicogenina este o proteină care îndeplinește rolul de primer: prin glicozilarea cu UDP-glucoză a unui rest de tirozină, se formează glicogenina glicozilată, care devine un nucleu de sinteză a glicogenului. Când numărul resturilor de glucoză depășește cifra 11, intervine enzima de ramificare, care îndepărtează un lanț de 7 resturi glicozidice, atașându-le printr-o legătură α-1,6 - glicozidică la un alt lanț (sau fragment de lanț), astfel se formează o ramificație.

7.1.2.3 Reglarea glicogenogenezei

Reglarea glicogenogenezei se poate realiza prin trei modalități: modificări covalente, mecanisme alosterice și reglare hormonală. Formele active ale enzimelor glicogenogenezei sunt formele defosforilate.

I. Reglarea covalentă și alosterică

Glicogen sintaza este activă în forma **a** defosforilată și inactivă în forma **b** fosforilată (*Figura 7.3*).

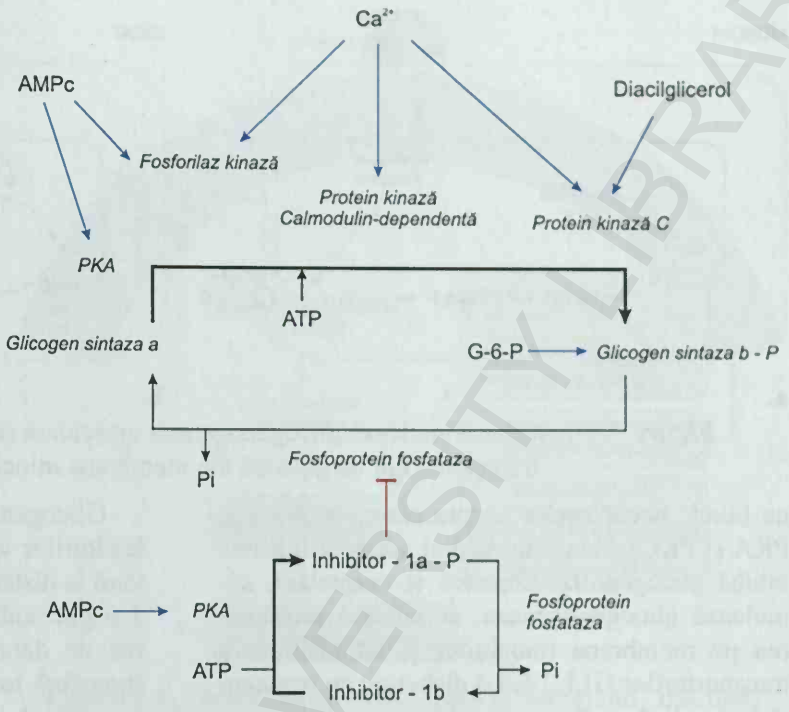


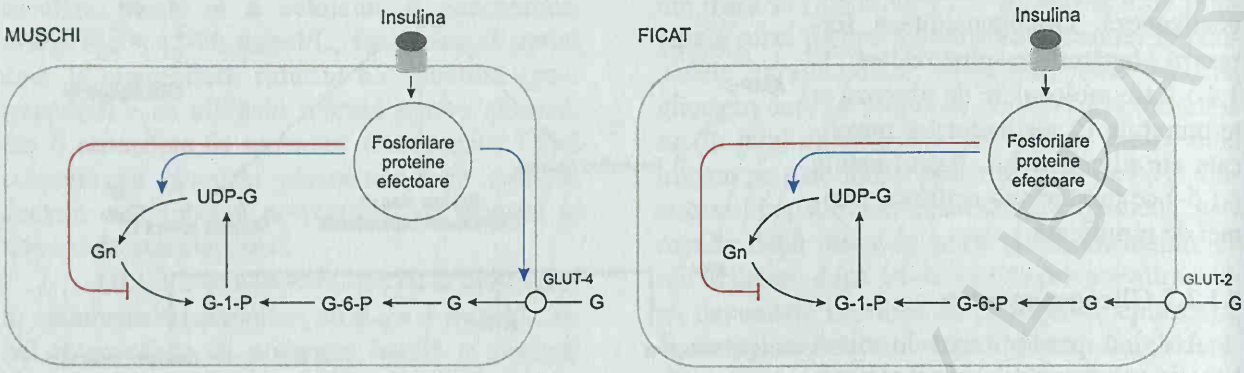
Figura 7.3. Reglarea covalentă și alosterică a glicogensintazei

Inactivatoarele glicogen sintazei sunt kinaze care catalizează fosforilarea acesteia: protein kinază A - AMPc dependentă, fosforilaz kinaza (AMPc și/sau Ca^{2+} dependentă), proteinkinaze Ca^{2+} dependente (conțin calmodulină), proteinkinaza C (DAG dependentă).

II. Reglarea hormonală – insulina

Creșterea glicemiei duce la eliberarea și creșterea secreției de insulină în celulele β pancreatice; astfel țesuturile dependente de insulină vor fi "atenționate" că există glucoză disponibilă (*Figura 7.4*). Pentru efectele de scurtă durată ale insulinei sunt responsabili mesagerii secunzi intra-citoplasmatici inozitol fosfoglicanici, care rezultă sub acțiunea stimulatoare a unor substraturi fosforilate ale receptorilor insulinici activați (IRS-1 și -2). Receptorii membranari ai insulinei sunt proteine complexe mari (450 kD) alcătuite din două subunități alfa externe legate prin punți disulfidice (care vin în contact cu insulina) și două lanțuri beta care penetrează membrana celulară. Lanțurile beta (mai exact porțiunile citosolice –COOH terminale) sunt autofosforilante (acțiune autocatalitică) în urma contactului lanțurilor alfa cu insulina; receptorul de insulină fosforilat este o tirozin-kinază, care va fosforila resturi de tirozină din diverse alte proteine intracitoplasmatice, care au la rândul lor activitate kinazică asupra unor resturi de serină și treonină ale unor protei-

BUCHAREST MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY



a. b.

Figura 7.4. Insulina stimulează glicogenogeneza musculară (a) și hepatică (b) și exprimarea transportorilor de glucoză din membrana miocitului - GLUT4

ne (altele decât acelea asupra cărora acționează PKA și PKC). Prin intermediul acestora insulina inhibă glicogenoliza hepatică și musculară, stimulează glicogenogeneza, stimulează exprimarea pe membrana miocitului și adipocitului a transportorilor GLUT4. La diabeticii cu rezistență la insulină au fost evidențiate mutații la nivelul subunităților alfa, care alterează transmiterea semnalului reglator spre subunitatea beta; dozele terapeutice de insulină la acești pacienți sunt de 10-100 ori mai mari.

7.1.2.4 Glicogenoliza

Este procesul ce are loc între mesele principale și are drept scop mobilizarea glucozei depozitate în perioadele de abundență energetică (postprandial) în glicogen, cu rolul de a menține glicemia și de a asigura țesuturilor consumatoare substratul energetic.

Șirul de reacții care au loc:

1. $G_n + Pi \xrightarrow{\text{Fosforilaza}} G_{n-1} + \text{G-1-P};$
2. $\text{G-1-P} \xrightarrow{\text{PG-mutaza}} \text{G-6-P};$
3. $\text{G-6-P} \xrightarrow{\text{G-6-P fosfataza}} \text{G} + Pi.$

Enzima „cheie" a glicogenolizei este fosforilaza, care eliberează succesiv din catenele glicogenului câte o moleculă de glucoză fosforilată (glucoză-1-fosfat). După izomerizarea enzimatică în glucoză-6-fosfat, acest produs poate să urmeze căile metabolice de descompunere anaerobă sau aerobă a glucozei (în mușchi, G-6-P trece direct în calea glicolitică și produce ATP), iar pe de altă parte defosforilarea lui de către glucoza-6-fosfat fosfatază, duce la eliberarea glucozei din hepatocite cu GLUT 2 (glucoza nu străbate membrana în formă fosforilată, molecula fiind încărcată electric), cu rol important în menținerea glicemiei.

Glicogen fosforilaza acționează doar asupra legăturilor α1-4 glicozidice, activitatea ei încetând la distanță de 4 resturi glucidice de legătura 1-6 glicozidică. În această etapă intervine enzima de deramificare cu activitate transferazică (transferă trei resturi de glucoză ale ramificației la capătul catenei principale) și glucozidazică (îndepărtează sub formă de glucoză liberă primul rest al fostei ramificații). Ramificațiile (legăturile-1,6-) catenelor se desfac, după care se continuă descompunerea porțiunilor lineare.

7.1.2.5 Reglarea glicogenolizei

Reglarea glicogenolizei se poate realiza prin trei modalități: modificări covalente, mecanisme alosterice și reglare hormonală. Formele active ale enzimelor glicogenolizei sunt formele fosforilate.

I. Modificări covalente

Glicogen fosforilaza are două forme: una fosforilată (**a** - activă) și alta nefosforilată (**b** - inactivă). Fosforilaza este o enzimă dimerică, cu 2 subunități de câte 97.000 D. Un radical de serină din poziția 14 este locul fosforilării.

Fosforilazokinaza este responsabilă pentru fosforilarea (activarea) glicogen fosforilazei (*Figura 7.6*). Fosforilazokinaza este alcătuită din 16 subunități: α_4, β_4, γ_4, δ_4; α, β și δ sunt subunități reglatoare, iar γ - unitatea catalitică – este calmodulina, care este activată de calciu (activator alosteric).

AMPc și ionii de calciu au efect activator asupra fosforilazokinazei, respectiv glicogen fosforilazei (aducându-le în formele **a**, fosforilate, active). Glucoza și ATP-ul sunt inhibitori alosterici ai glicogen fosforilazei a. AMPc are efect stimulator asupra fosforilării inhibitorului 1 al fosfatazei (enzimă care transformă glicogen fosforilaza **a** în glicogen fosforilază **b** (*Figura 7.6*).

II. Mecanisme alosterice

Glicogen fosforilaza este supusă activării alosterice prin AMP (care acționează asupra formei b). Inhibiția alosterică este realizată prin ATP și glucoză asupra formei a. De fapt, fosforilaza a hepatică "funcționează" ca un acceptor citoplasmatic pentru glucoză. Fosforilaza musculară este reglată alosteric de cuplul ATP/AMP (care reflectă necesitățile energetice ale mușchiului).

Concentrația AMP-ului crește după activități musculare intense, acesta fiind activator alosteric al glicogen fosforilazei. Concentrația crescută de ATP este un inhibitor alosteric al glicogen fosforilazei.

III. Reglarea hormonală – glucagonul și adrenalina

Glucagonul și adrenalina stimulează glicogenoliza în ficat. Glucagonul are efect hiperglicemiant și prin inhibarea glicogensintazei, 6-fosfofructo-kinazei și a piruvat-kinazei. Glucagonul acționează prin intermediul AMPc, generat din ATP de adenilat ciclază (enzimă activată de proteinele G - subunitatea αs- aflate în relație cu receptorul de glucagon) (*Figura 7.7a*); AMPc activează protein kinaza A – PKA – prin intermediul căreia fosforilează glicogensintaza (la forma inactivă **b**), fosforilaz kinaza (la forma activă **a**) și inhibitorul-1 (a), care împiedică inactivarea fosforilazei active.

Adrenalina acționează pe trei căi:

1. stimulează eliberarea glucagonului din celulele α pancreatice;
2. prin intermediul β receptorilor hepatocitari, stimulează sinteza AMPc cu efecte similare glucagonului;
3. prin α receptorii hepatocitari cuplați cu fosfolipaza C (enzimă activată de proteinele G -subunitatea αi), determină activarea fosfolipazei C cu formarea diacilglicerolului (DAG) și inozitoltrifosfatului (IP3) ca mesageri secundari. DAG activează protein kinaza C – PKC - care determină fosforilarea mai multor enzime citoplasmatice (inclusiv a glicogen sintazei și fosforilazei). Apariția IP3 în citoplasmă conduce la creșterea concentrației calciului (*Figura 7.7b*). Calmodulina activată de calciu stimulează fosforilaz kinaza și astfel - glicogenoliza.

În mușchi, adrenalina favorizează glicogenoliza cuplându-se la β receptori, care prin adenilat ciclază duc la formare de AMPc (*Figura 7.8*).

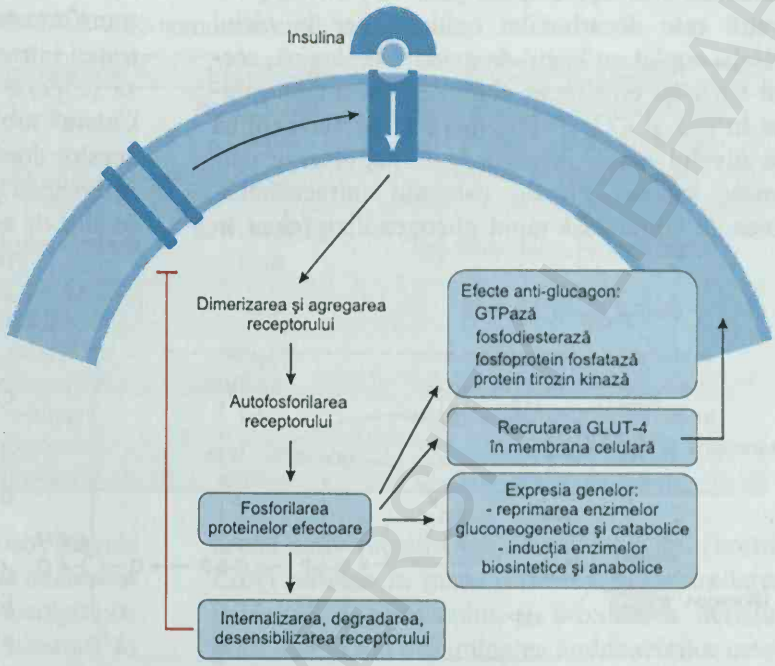


Figura 7.5. Transmiterea intracelulară a "mesajului" insulinei

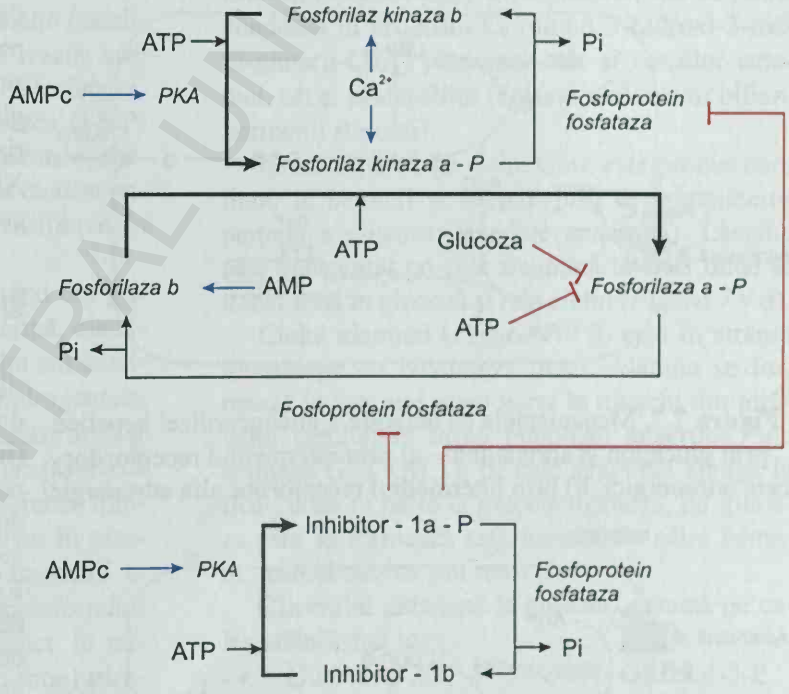


Figura 7.6. Reglarea covalentă și alosterică a fosforilazei

BCU "M. EMINESCU" IAȘI

Glucoza este descompusă până la piruvat, piruvatul este decarboxilat oxidativ, iar în ciclul Krebs cuplat cu lanțul de oxidare biologică, acetil CoA își eliberează energia, descompunându-se în apă și CO_2. Prin eliberarea de acetilcolină la nivelul plăcii neuromotorii, impulsurile nervoase măresc nivelul calciului intracitosolar, ceea ce stimulează rapid glicogenoliza (chiar în lipsa catecolaminelor), eliberarea glucozei și transformarea ei în piruvat. Creșterea concentrației intracelulare de calciu induce glicogenoliza (*Figura 7.8*) și paralel contracția musculară. Calciul are un rol important în sincronizarea acestor două procese. Un al treilea mecanism de activare a glicogenolizei musculare este acela produs de activarea fosforilazei de către AMP-ul rezultat în urma descompunerii ATP. Efectele stimulatoare ale ionului de calciu și AMP-ului, asigură răspunsul la nevoile energetice ale musculaturii, chiar în lipsa stimulării hormonale.

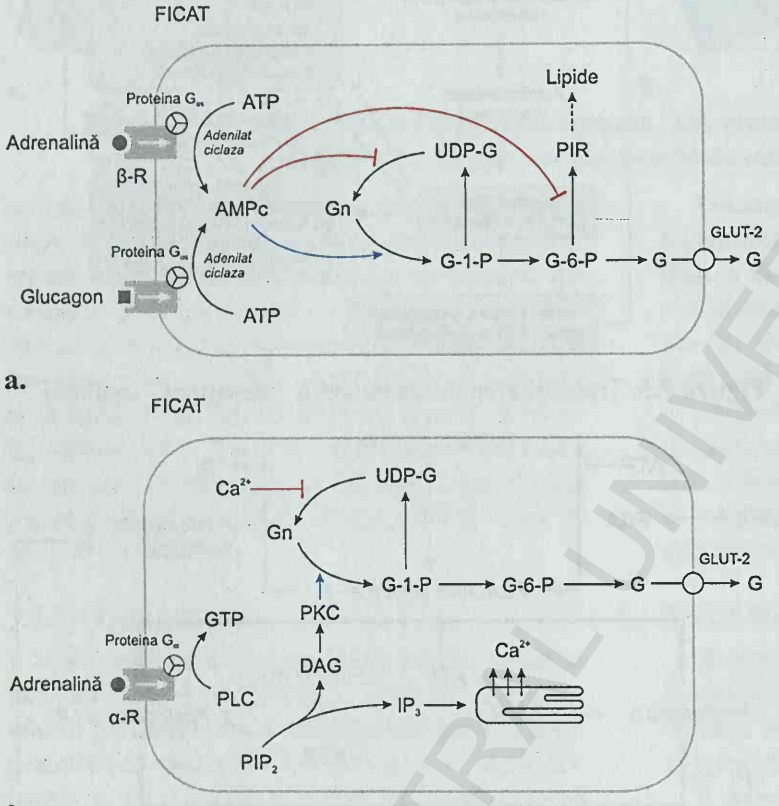


Figura 7.7. Mecanismele de activare a glicogenolizei hepatice prin glucagon și adrenalină – a) prin intermediul receptorilor beta adrenergici, b) prin intermediul receptorilor alfa adrenergici

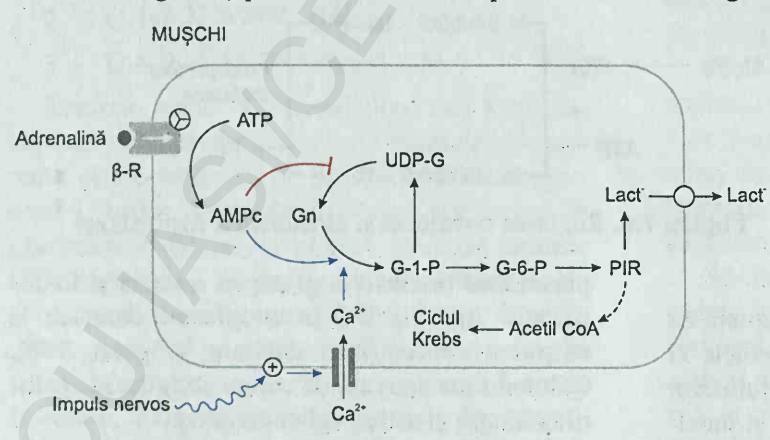


Figura 7.8. Efectul adrenalinei și acetilcolinei asupra miocitului – activarea glicogenolizei și glicolizei musculare în timpul exercițiului fizic

7.1.2.6 Deficite ereditare ale metabolismului glicogenului

În cazuri de lipsă ereditară a uneia dintre enzimele cuprinse în glicogenoliză, dar și în unele faze mai incipiente ale metabolismului glucozei, glicogenul se acumulează în hepatocite sau în fibrele musculare, ducând la apariția diferitelor forme ale glicogenozelor, prezentate în *Tabelul 7.I.* Sunt descrise actualmente cel puțin 14 tipuri de glicogenoze, unele dintre ele fiind variante ale altora (de exemplu tipurile XII, XIII și XIV sunt subtipuri al glicogenozei McArdle).

7.1.3 Formarea glucozei din alte substanțe: Gluconeogeneza

Deși majoritatea organelor și țesuturilor își acoperă necesitățile de glucoză din sângele circulant, în unele organe (ficatul, rinchii), pe baza reversibilității reacțiilor glicolizei, alte substanțe (acidul lactic, glicerolul, aminoacizii glucogenetici) pot fi transformate în glucoză. Există totuși trei etape ireversibile ale descompunerii glucozei, care trebuie ocolite: 1) descompunerea fosfo-enol-piruvatului, 2) descompunerea acidului 1,3-difosfogliceric și 3) fosforilarea glucozei. Primul by-pass se realizează în felul următor: în granulele membranei exterioare a mitocondriilor, acidul piruvic fixează o moleculă de CO_2 și se transformă în acid oxalacetic (reacție catalizată de piruvat carboxilază). Pentru a depăși bariera de permeabiliate a membranei mitocondriale, oxal-acetatul

Tabel 7.I. Glicogenozele ereditare

Tip	Denumire	Defecțiune enzimatică	Localizare	Semne/ Simptome
I	von Gierke	Glucoză-6-fosfataza	ficat, rinichi, intestin	hepatomegalie, hiperuricemie, hipoglicemie, hiperlipidemie
II	Pompe	Amilo- α(1,4)-glucozidaza	lizozomi	cardiomegalie, slăbiciune musculară
III	Forbes, Cori	Amilo- α (1,6)-glucozidaza	ficat, mușchi, cord	hepatomegalie, hipoglicemie
IV	Andersen	Amilo-α(1,4-1,6)-transglucozidaza	ficat	ciroză hepatică, ascită
V	McArdle	Fosforilaza musculară	mușchi	oboseală, crampe musculare
VI	Hers	Fosforilaza hepatică	ficat	hepatomegalie, hipoglicemie
VII	Tarui	Fosfofructo-kinaza	ficat	hepatomegalie, hipoglicemie
VIII		Fosfohexoizomeraza	ficat	oboseală
IX		Fosforilaza b kinaza	mușchi	oboseală, crampe

se reduce la malat, acesta iese în citosol (naveta malat-oxalacetat), unde se reoxidează la oxalacetat și se decarboxilează sub acțiunea fosfoenolpiruvat carboxikinazei (folosește GTP ca și substrat) în fosfoenol-piruvat. Inversarea reacțiilor următoare înaintează până la ocolirea următoarei faze ireversibile, a formării a fructoză 1,6-difosfatului (catalizată de fosfo-fructokinaza 1); această reacție este ocolită prin utilizarea fructoză 1,6-bisfosfatazei. Cea de a treia etapă ireversibilă (formarea G-6-P) este ocolită de glucoză-6-fosfatază. Gluconeogeneza este un proces extrem de eficient și modest endergonic - fiecare mol de piruvat transformat în glucoză consumând 4 moli de ATP.

Piruvatul se formează în primul rând din glicoliză, dar provine și din alanină, serină, cisteină, glicină, treonină. Transformarea lui enzimatică reductivă (sub acțiunea lactat dehidrogenazei - LDH) în acid lactic, înseamnă în același timp și regenerarea NAD^+-ului care asigură desfășurarea glicolizei în condiții anaerobe. Sub acțiunea transaminazelor, alanina se transformă ușor în piruvat, deschizând astfel, prin unii componenți ai ciclului acizilor tricarboxilici, calea transformării în glucoză a aminoacizilor glucogenetici. În mitocondrii (prin fixare de bioxid de carbon) piruvatul se transformă în oxalacetat, pe de o parte inițiatorul ciclului acizilor tricarboxilici, pe de altă parte al ocolirii inversării descompunerii fosfoenol-piruvatului. Prin faptul că oxalacetatul este utilizat atât în ciclul acizilor tricarboxilici, cât și în gluconeogeneză, în cazul unei inhibiții a ciclului Krebs printr-un exces de ATP, oxalatul poate fi dirijat spre gluconeogeneză, iar în caz de deficit de ATP - spre descompunere. În sfârșit, prin decarboxilare piruvatul se transformă în acetat activ (acetil-CoA). Acetatul activ (acetil-CoA) provine în mare parte din decarboxilarea oxidativă a piruvatului și ß-oxidarea acizilor grași, dar și din dezaminarea aminoacizilor cetogenetici. Acest fragment C_2 se descompune mai mult în ciclul acizilor tricarboxilici, dar se poate condensa în produsul C_6 (numit 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) precursor atât al corpilor cetonici, cât și al sterolilor (colesterolul, acizii biliari, hormonii steroizi).

Lactatul parcurge ciclul Cori: este produs continuu în hematii și mușchi prin descompunerea parțială a glucozei (oxidare anaerobă). Lactatul este transportat pe cale sanguină la ficat unde se transformă în glucoză și reia ciclul (*Figura 7.9 a*).

Ciclul alaninei (*Figura 7.9 b*) este în strânsă interrelație cu biosinteza ureei. Alanina se formează în cea mai mare parte în mușchi din piruvatul rezultat in urma glicolizei anaerobe, sub acțiunea GPT (ALT); pe cale sanguină ajunge în ficat, unde ia parte la gluconeogeneză, iar glucoza care se formează este folosită de către hematii, țesutul nervos sau muscular.

Glicerolul participă la gluconeogeneză pe calea arătată mai jos:

- Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{Glicerol kinaza}}$ Glicerol-3-P
- Glicerol-3-P + NAD^+ $\xrightarrow{\text{Gl-3P-DH}}$ $\longrightarrow$ Dihidroxiaceton fosfat + $NADH+H^+$
- Dihidroxiaceton fosfat $\xleftarrow{\text{Triozofosfat izomeraza}}$ $\longleftrightarrow$ Glicerinaldehid-3-P $\longrightarrow$ G

Reiese că reglarea reacțiilor glicolizei și ale gluconeogenezei se manifestă în sens opus: în cazul în care transformările dintr-un sens se desfășoară cu o intensitate mare, reacțiile în sens invers abia funcționează sau sunt blocate. Enzima cheie a gluconeogenezei este fructoza-1,6-difos-

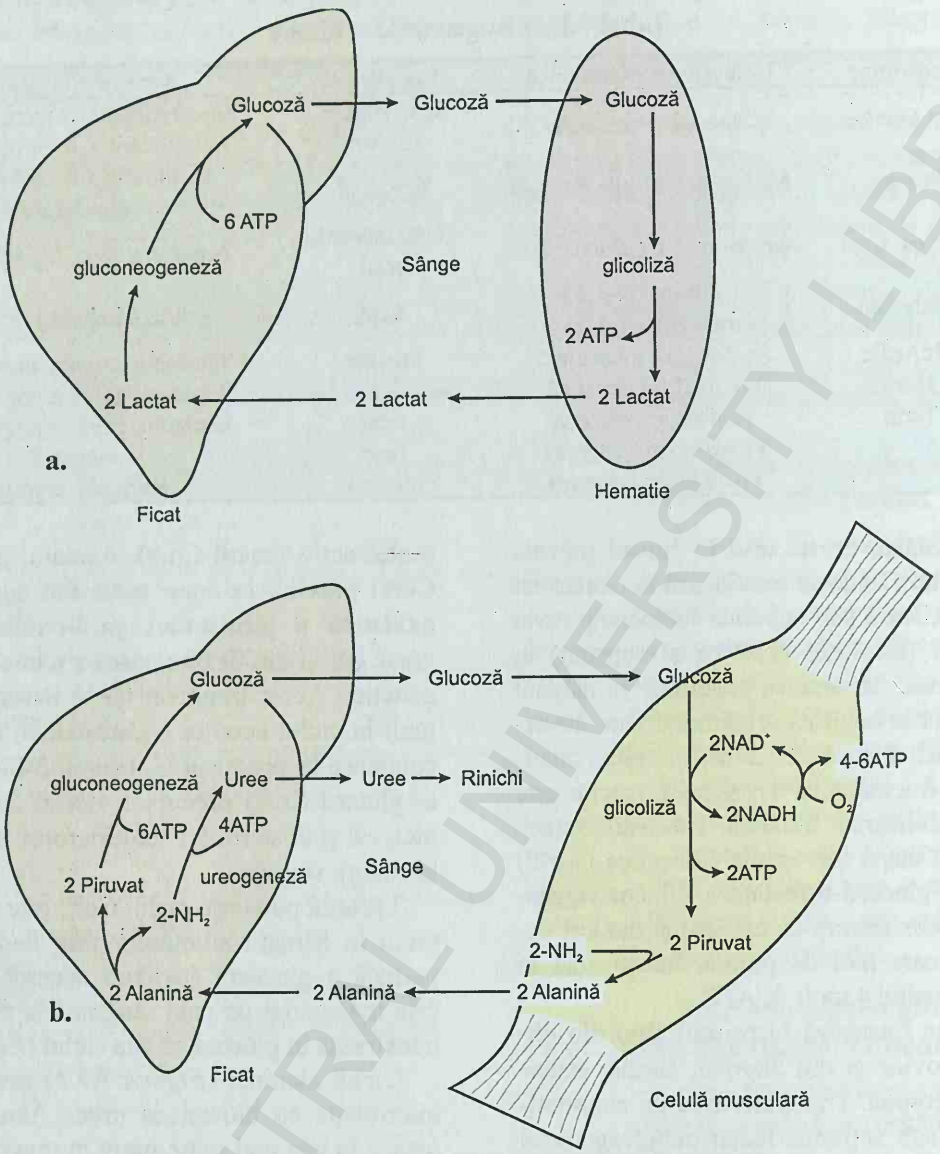


Figura 7.9. Ciclul lactatului - Cori (a) și ciclul alaninei (b)

fataza, a cărei activitate este puternic inhibată de AMP (produs de descompunere al ATP), care în același timp este și un puternic activator al fosfofructo-kinazei (vezi *7.3.1.2*).

7.2 Utilizarea glucozei de către celulele organismului

7.2.1 Glicoliza

La baza transformărilor bioenergetice intracelulare ale organismelor heterotrofe, stă inversarea reacțiilor de fotosinteză, adică eliberarea energiei acumulate de organismele autotrofe (plantele verzi), prin absorbția și depozitarea energiei fotonului verde. Celulele organismului utilizează diferit glucoza, toate posedă însă echipamentul enzimatic al căii Embden-Meyerhof (glicoliza anaerobă).

Glicoliza este o cale rapidă, destinată obținerii de energie (în cantitate mică: 2 moli de ATP / moleculă de glucoză) chiar în condiții de anaerobioză.

În anaerobioză, descompunerea glucozei (glicoliza) are loc în 10 etape enzimatice succesive, pornind de la glucoză-6-fosfat (produsul activat, format în celule sub acțiunea hexokinazei, respectiv a glucokinazei, prin consumarea unei molecule de ATP) – *Figura 7.10*. Ecuația generală și bilanțul energetic al glicolizei anaerobe, este:

α-D glucoză + 2 ADP^{3-} + 2 Pi^{2-} → 2 L-lactat + 2 ATP^{4-}.

Glucoză-6-fosfatul este produsul reacției catalizate în hepatocite de către hexokinază sau gluco-

kinază, în prezența ATP. Acest produs poate să urmărească mai multe căi de transformare: poate fi defosforilat și eliberat din hepatocite în sângele circulant; sub forma glucoza-1-fosfatului, poate fi fixat în lanțurile polizaharidice ale glicogenului; în cadrul ciclului pentozofosfaților se transformă în riboză-5-fosfat și echivalenți reducători; prin glicoliză, poate fi descompus până la piruvat. Produsul final al glicolizei îl constituie acetatul activat (cuplat cu coenzima A, sub formă de Acetil-CoA), realizând un fond metabolic comun al produșilor identici ai celorlalte substanțe.

Produșii acestui fond comun pot fi utilizați pentru multiple scopuri (acetilări, condensări, conversiuni în aminoacizi, acizi grași, corpi cetonici și steroli), dar marea lor majoritate intră în ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs); scheletul de atomi de carbon se transformă în dioxid de carbon, iar echivalenții reduși rezultați se transformă ulterior prin lanțul respirator în apă, cu formare de ATP. În prezența oxigenului, glicoliza este doar o etapă preparatorie în metabolismul aerob al glucozei. Oxigenul inhibă glicoliza anaerobă (acest fenomen se numește efect Pasteur), fiindcă în prezența oxigenului se produce o cantitate mult mai mare de ATP decât în condiții anaerobe și se formează suficientă energie chiar și în condițiile unei glicolize mai lente.

Ecuația generală și bilanțul energetic al glicolizei aerobe, este:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 + 38\ ADP^{3-} + 38\ H^+ + 38\ Pi^{2-} \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 38\ ATP^{4-}$$

7.2.2 Ciclul acizilor tricarboxilici: calea finală comună a degradării metaboliților

În cursul metabolizării substanțelor nutritive fiecare categorie de substanță (aminoacizi, glucide, lipide) se descompune prin reacții biochimice specifice, mai mult sau mai puțin numeroase, în aceleași fragmente simple cu 2 atomi de carbon (C_2: Acetil-CoA). Cantitatea totală a acestor produși formează un fond metabolic comun, al cărui volum se menține constant prin echilibrul între producție și consum.

De o importanță substanțială este faptul că descompunerea oxidativă a acestor produși C_2 se realizează prin același mecanism comun, indiferent de proveniența lor protidică, glucidică sau lipidică. Aminoacizii ajung la această formă premergătoare, practic prin dezaminarea și decarboxilarea lor succesivă. Acizilor grași le sunt necesare pentru descompunerea în fragmente C_2 cele 4 faze ale ß-oxidării (spirala Lynen). În schimb, descompunerea anaerobă a glucozei (glicoliza) cuprinde 10 faze succesive (completate cu decarboxilarea oxidativă a piruvatului), în cursul cărora nu numai că apare produsul final C_2, dar și o serie de metaboliți, substratele unor procese de biosinteză, respectiv activatori sau inhibitori ai unor enzime cheie.

Ciclul acizilor tricarboxilici (*Figura 7.11*) este o secvență de opt reacții enzimatice, începând cu condensarea unui fragment C_2 (acetatul activ) cu unul C_4 (aci-

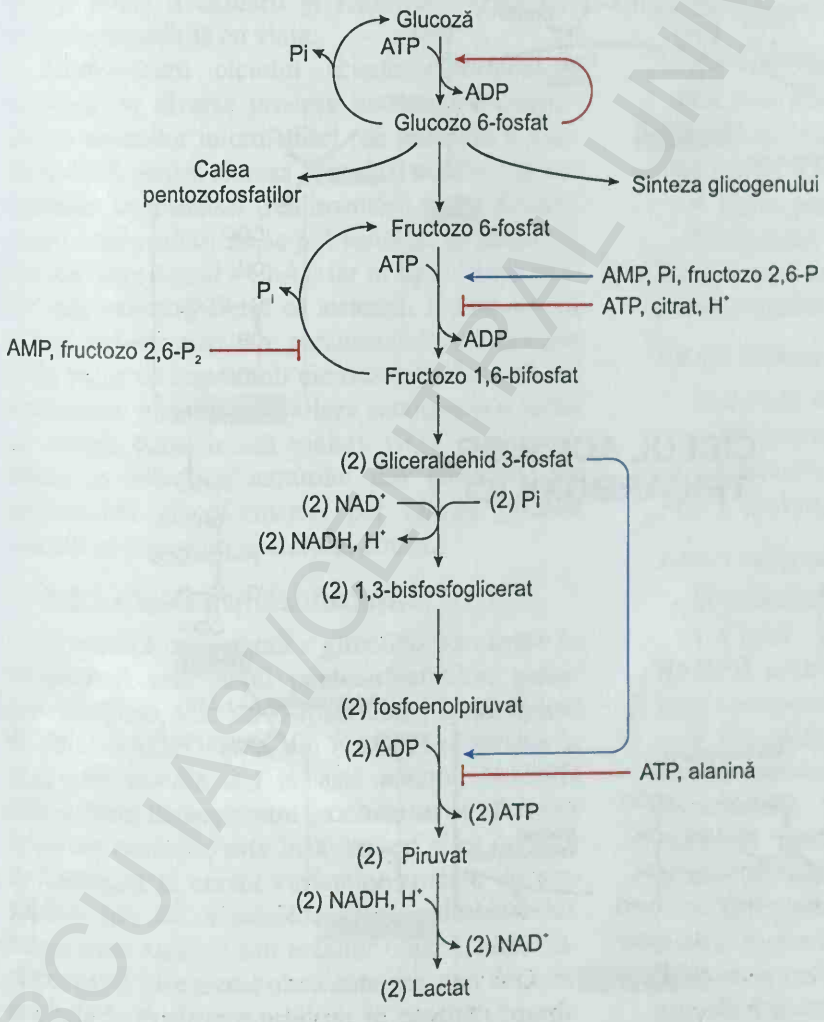


Figura 7.10. Etapele glicolizei și reglarea acestora

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dul oxalacetic); se formează un compus C_6 (acidul citric), sub acțiunea unei enzime de condensare (citrat sintaza). Oxalacetatul se regenerează la parcurgerea completă a ciclului. Din cele patru oxidări care au loc în ciclu, două implică decarboxilare. În cursul transformărilor succesive ale ciclului, cei 2 atomi de carbon ai acetatului activ, se transformă în bioxid de carbon, însă practic fără degajare directă de energie. Eliberarea propriu-zisă a energiei, se realizează prin oxidarea atomilor de hidrogen al acetatului, fixați de către coenzimele dehidrogenazelor (NAD^+, FAD), care astfel se reduc (NADH, $FADH_2$) în cele patru reacții redox: trei produc NADH, iar una – $FADH_2$. În reacția a cincea are loc o fosforilare la nivel de substrat, în urma căreia se produce GTP.

Desfășurarea continuă a ciclului se asigură prin regenerarea oxalacetatului și reoxidarea coenzimelor în lanțul de oxidare biologică și transmiterea separată, sub formă de protoni (H^+) și electroni (e^-) a hidrogenului spre oxigenul molecular. Ionii de H^+ rămân acumulați în matrixul mitocondriilor, producând un gradient însemnat de H^+, iar electronii se transportă prin sistemul heminenzimelor (citocromii b, c și a3), component al lanțului de oxidare biologică.

Cantitatea de energie liberă a reacției de ardere a hidrogenului în atmosfera de oxigen (a formării apei) nu se eliberează dintr-o dată, ci în 3 etape, în cursul cărora se formează câte un compus macroergic (ATP). Astfel, în cursul formării oxidative a fiecărei molecule de apă, se sintetize-

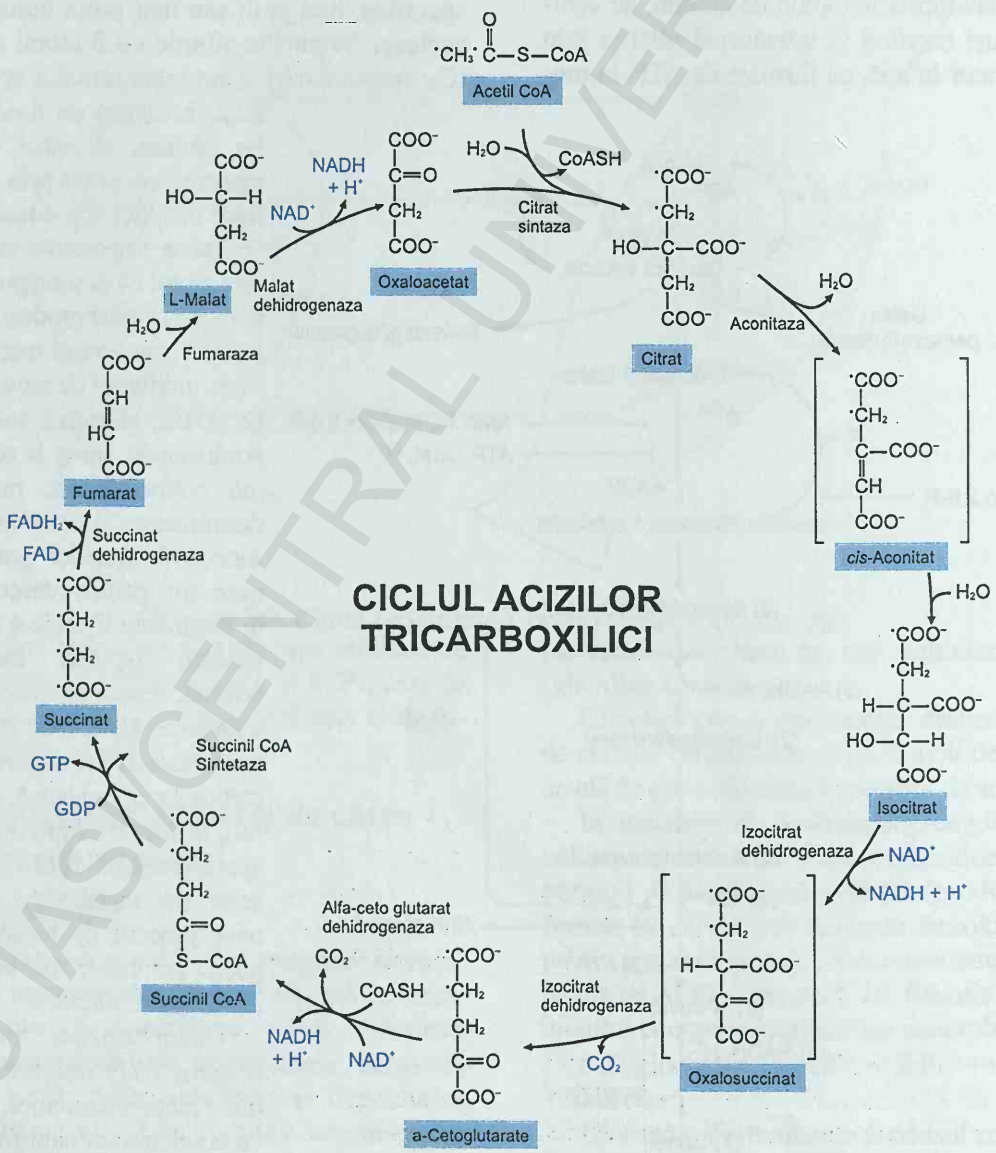


Figura 7.11. Succesiunea reacțiilor în ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs)

ază 3 molecule de ATP, ceea ce înseamnă, că valoarea raportului dintre cantitatea oxigenului consumat şi a fosfatului macroergic format este: P/O = 3. Această valoare corespunde unui randament de 40 % al utilizării energiei libere a substratelor oxidate, valoare mult superioară randamentului motoarelor cu ardere internă. La fiecare parcurgere a ciclului Krebs, descompunerea unui mol de Acetil~CoA, generează suficiente coenzime reduse pentru sinteza în lanțul de oxidare biologică a 11 moli de ATP; adăugând compusul macroergic (GTP) rezultat în fosforilarea la nivel de substrat, bilanțul descompunerii unui mol de Acetil~CoA este de 12 echivalenți ATP.

Unele substanțe toxice, ca meta-dinitro-benzenul (mDNB), decuplează oxidarea hidrogenului de etapele fosforilării, adică de înmagazinarea energiei libere în ATP. Această decuplare poate să se manifeste la unul, sau la toate nivelele fosforilării. În funcție de numărul treptelor decuplate, scade şi valoarea P/O, la 2 respectiv la 1. Decuplarea totală a oxidării şi fosforilării (P/O = 0) este incompatibilă cu viața.

Intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici participă în diverse procese biosintetice; consumarea anumitor intermediari (de exemplu a Succinil~CoA pentru sinteza hemului) conduce la necesitatea anaplerozei (realimentării ciclui Krebs); aceşti intermediari nu se pot sintetiza în interiorul ciclului (din Acetil ~CoA), iar în lipsa "alimentării" din exterior, ciclul se sistează. Există câteva reacții anaplerotice care garantează faptul că acest ciclu nu se va împotmoli niciodată din lipsă de intermediari: piruvat carboxilaza catalizează o astfel de reacție (sintetizează malat), GOT catalizează obținerea alfacetoglutaratului din glutamat, iar aminoacizii glucoformatori pot furniza piruvat sau alți intermediari ai ciclului Krebs.

7.2.3 Ciclul pentozofosfaților

O ramură importantă a glicolizei localizate în citoplasmă este ciclul pentozofosfaților, pornit prin oxidarea glucozo-6-fosfatului (dehidrogenat de către $NADP^+$). 60% din NADPH-ul produs în organism rezultă din această reacție; NADPH este extrem de important în diminuarea efectelor stresului oxidativ, este însă utilizat şi ca donator de hidrogen în cursul variatelor procese de biosinteză (de ex. a acizilor graşi, colesterolului, hormonilor steroizi sau acizilor biliari), astfel încât această cale metabolică este una mai degrabă anabolică. Pentozele produse în cantități însemnate în acest ciclu, sunt importante în procesele de sinteză ale acizilor nucleici.

Ciclul pentozofosfaților este divizat într-o fază redox ireversibilă (din care rezultă NADPH şi pentozofosfații) şi o fază reversibilă, a interconversiilor excesului de pentozofosfați neutilizați în intermediari ai glicolizei (F-6-P şi Glicerinaldehid-3-P).

7.2.4 Căile majore de metabolizare a glucozei în diverse țesuturi (*Figura 7.12*)

7.2.4.1 Hematia

În hematii are loc:

- Glicoliza anaerobă (aproximativ 90% din glucoza utilizată de hematii).
- Calea pentozo-fosfaților, a cărui rol major este producerea de pentoze (componente importante ale acizilor nucleici) şi producerea de NADPH + H^+, necesar regenerării (reducerii) glutationului (G-SH). G-SH este indispensabil în menținerea integrității ADN-ului, a membranelor celulare şi ale organitelor subcelulare.

7.2.4.2 Celula nervoasă

La acest nivel are loc:

- Glicoliza completată cu decompunerea aerobă (ciclul Krebs şi lanțul de oxidare biologică),
- Calea pentozofosfaților.

Pătrunderea glucozei în celulele nervoase şi în hematii este insulino-independentă (se realizează prin intermediul transportorilor GLUT1 şi GLUT3).

7.2.4.3 Celula musculară

În mușchi are loc:

- Glicogenogeneza şi glicogenoliza;
- Glicoliza anaerobă +/- aerobă;
- Ciclul pentozo-fosfaților.

7.2.4.4 Adipocitul

În țesutul adipos are loc:

- Ciclul pentozofosfaților, care produce NADPH necesar sintezei "de novo" a acizilor graşi (componente ale trigliceridelor).
- Glicoliza anaerobă are ca intermediar glicerol-3-fosfatul (se poate utiliza şi la sinteza trigliceridelor), iar piruvatul prin decarboxilare oxidativă produce acetil-coenzimă A, materia primă a sintezei acizilor graşi.
- Glicogenogeneza şi glicogenoliza sunt limitate. În țesutul muscular şi în adipocite, glucoza intră în celule stimulată de insulină (prin intermediul transportorului GLUT4).

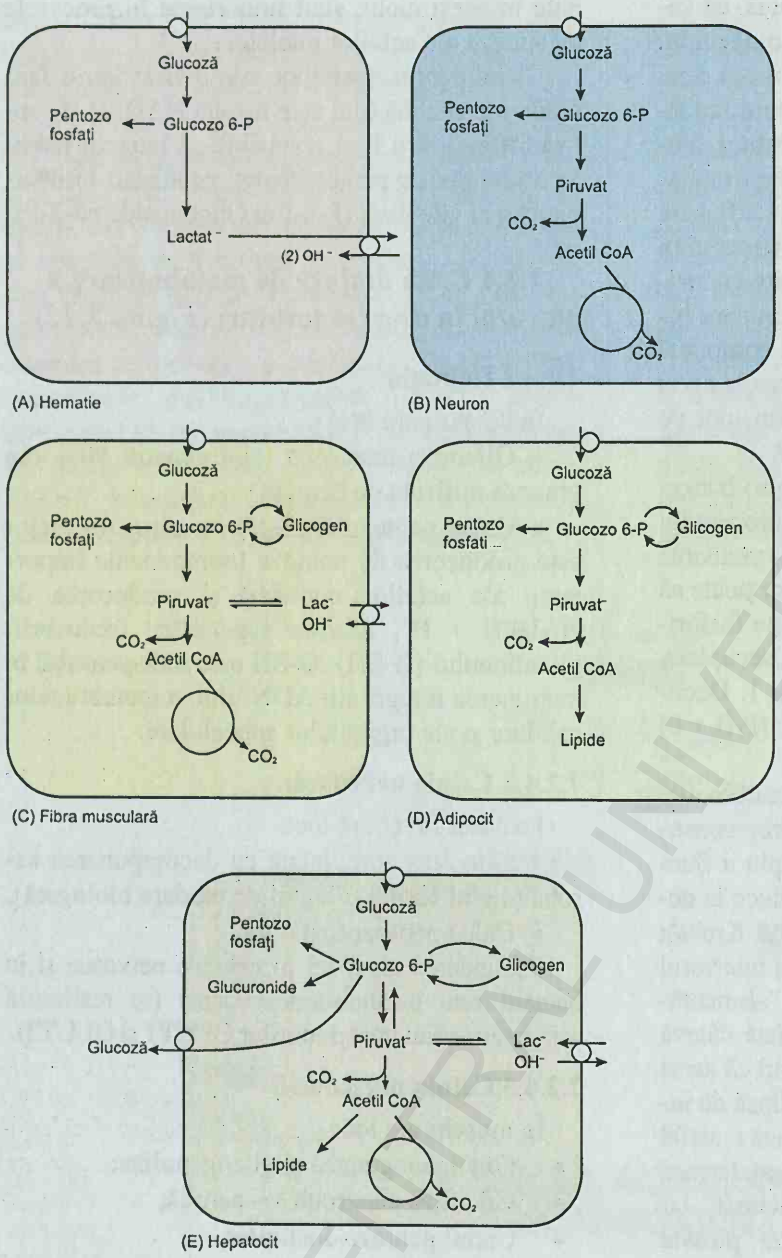


Figura 7.12. Căile de utilizare a glucozei de către celulele organismului

7.2.4.5 Hepatocitul

În ficat au loc:

- Ciclul pentozofosfaților, care produce pentoze necesare sintezei acizilor nucleici, ATP-ului, și NADPH-ul folosit la sinteza acizilor grași și pentru regenerarea glutationului.
- Glicogenogeneza/glicogenoliza
- Glicoliza anaerobă/aerobă: în ficat prima enzimă a acestei căi este glucokinaza, spre deosebire de alte țesuturi (mușchi, creier, etc.), unde primul catalizator este hexokinaza.
- Gluconeogeneza din compuși cu trei atomi de carbon (lactat, piruvat, alanină);
- Sinteza lipidelor (trigliceride, colesterol etc.);
- Sinteza acidului glucuronic, acesta fiind necesar detoxificării bilirubinei (prin procesul de glucuronoconjugare), a medicamentelor și a altor substanțe toxice pentru organism.

7.3 Mecanismele de reglare ale metabolismului

Coordonarea în spațiu și timp a reacțiilor biochimice din organism necesită prezența și funcționarea unui sistem complex de reglare, care controlează totalitatea transformărilor, de la cele mai simple până la cele mai complexe. Scopul fundamental al acestei coordonări, îl constituie pe de o parte menținerea continuă a structurilor și a funcțiilor ordonate ale celulei, iar pe de altă parte, adaptarea neîntreruptă a acesteia la condițiile mereu schimbătoare ale mediului.

Mecanismele de reglare ale metabolismului celular, se bazează pe următoarele criterii:

- asigurarea eterogenicității spațiului biologic prin existența diferitelor compartimente intracelulare delimitate. Acest aranjament compartimentat intracelular asigură cuplarea reciprocă, prin interacțiuni cooperative, a funcțiilor localizate într-un compartiment, cu structurile funcționale din alte compartimente delimitate. Din această cauză, funcțiile integrate prin cooperare (din punctul de vedere al randamentului), vor reprezenta totdeauna mult mai mult decât suma algebrică a capacității funcționale a elementelor constitutive individuale.
- dinamismul metabolismului: reacțiile de biosinteză și de descompunere se desfășoară paralel. Alternarea sensului metabolic între aceste două transformări opuse, se stabilește (de la moment la moment) de starea funcțională a diferitelor fonduri metabolice comune.
- reglarea retroactivă (feedback) se manifestă la nivelul reacțiilor reversibile individuale. Acu-

mularea produsului, din cauza neutilizării lui, inhibă imediat desfăşurarea transformării, prin inversarea desfăşurării reacției.

- reglarea vitezei şi modificarea sensului unor lanțuri (succesiuni) de reacții, prin modificarea desfăşurării reacțiilor de reglare având viteza de reacție cea mai lentă, dintre cele cuprinse în serie. Aceste reacții de reglare se situează la punctele nodale ale transformărilor metabolice, ca formarea glucoză-6-fosfatului, a piruvatului, a acetil-CoA, a fructoză-2,6-bifosfatului.

7.3.1. Reglarea glicolizei

Există trei enzime cheie în cadrul glicolizei: hexokinaza, 6-fosfofructo-kinaza, piruvat-kinaza.

Enzima reglatoare este subiectul controlului unei căi metabolice prin efectori allosterici sau modificări covalente. Datorită controlului impus asupra enzimei reglatoare, aceasta va cataliza reacții de "non-echilibru", în timp ce restul enzimelor catalizează în general reacții "de echilibru".

7.3.1.1 Hexokinaza şi glucokinaza

Hexokinaza se găseşte în diferite țesuturi sub forma diferitelor izoenzime. Majoritatea au K_M = 0,1 mmol/L = 18 mg/dL (concentrația glucozei sanguine fiind în medie de 5 mmol/L = 90 mg/dL). Acesta este un aspect foarte important mai ales pentru neuron, care are acces astfel la glucoză, chiar la concentrații mici ale glucozei sanguine. Hexokinaza este inhibată de produsul de reacție: glucozo-6-fosfat, aspect important deoarece împiedică utilizarea întregului fosfat intracelular în formarea compuşilor fosforilați.

Glucokinaza este o izoenzimă a hexokinazei aflată doar în hepatocit, are K_M = 10 mmol/L, ceea ce acordă ficatului proprietatea de a "tampona" nivelurile crescute ale glicemiei în perioadele postprandiale. Glucoza străbate liber membrana hepatocitului, cu o rată de traversare direct proporțională cu concentrația glucozei sanguine. Insulina facilitează transcripția genei glucokinazei, enzima nefiind inhibată de produsul de reacție (glucozo-6-fosfat), ca şi hexokinaza.

7.3.1.2. 6-fosfofructo-1-kinaza

Aceasta este enzima limitantă de viteză în calea glicolitică, este un tetramer cu 340 kDa. Efectorii alosterici pozitivi sunt AMP, fructozo-2,6-difosfatul, fosfatul anorganic, iar efectorii negativi sunt ATP, citratul, protonii. Controlul hormonal

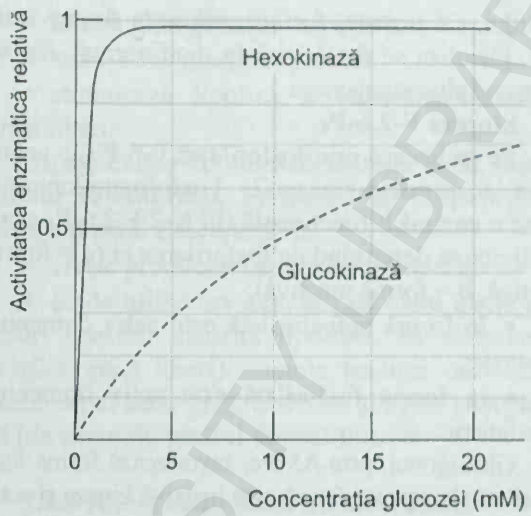


Figura 7.13. Variația vitezei de reacție a hexokinazei şi glucokinazei în funcție de concentrația substratului

asupra 6 fosfofructo-kinazei-1 se realizează prin intermediul AMPc şi fructozo-2,6-difosfat.

Rata glicolizei se va modifica în funcție de:

- statusul energetic celular (raportul ATP/AMP, fosfat anorganic),
- disponibilitatea surselor de energie alternative: acizi graşi liberi, corpi cetonici,
- pH-ul intern celular (concentrația protonilor),
- raportul sanguin insulină/ glucagon (prin fructozo-2,6-difosfat).

Fructozo-2,6-difosfatul (F-2,6-P_2) este un compus prezent în toate țesuturile, recent descoperit, fiind cel mai important reglator pozitiv al fosfofructo-kinazei-1. Deşi nu este un intermediar al căii glicolitice, funcționează ca şi moleculă reglatoare. Modul de acțiune se cunoaşte mai ales în ficat. În principal glucagonul, prin AMPc (ca şi mesager secundar) scade nivelul F-2,6-P_2 şi implicit inhibă glicoliza. Fructoză-2,6-difosfatul este reglatorul principal al glicolizei şi al gluconeogenezei în hepatocite. La baza acestui mecanism de reglare stă stimularea, respectiv inhibiția funcționării enzimelor fosfofructokinaza şi fructoză-2,6-difosfataza. Cea din urmă, sub formă defosforilată acționează ca o kinază, sub formă fosforilată însă prezintă activitatea unei fosfataze. Schema mecanismului de reglare a glicolizei şi a gluconeogenezei de către glucagon, prin intermediul fructoză-2,6-difosfatului, este prezentată în *Figura 7.14.*

În prezența insulinei şi a glucozei, enzima se defosforilează (devine activă kinaza), ceea ce duce la creşterea marcată a cantității fructoză-2,6-difos-

fatului. Ca urmare, fosfofructokinaza devine activă, glicoliza se desfăşoară în mod normal, dar se opreşte gluconeogeneza.

Sinteza F-2,6-P_2

Se realizează prin fosforilarea F-6-P sub acțiunea fosfofructo-kinazei-2. Fosfofructo-kinaza-2 este o enzimă bifuncțională (PFK-2/F-2,6-P_2-aza), activitatea depinzând de fosforilarea ei (a = forma activă, b = forma inactivă):

- în formă nefosforilată este activ domeniul kinazic;
- în forma fosforilată este activ domeniul fosfatazic.

Glucagonul, prin AMPc, favorizează forma fosforilată (în această formă este inactivă kinaza şi activă fosforilaza), scade concentrația fructozo-2,6-difosfatului, scade activitatea fosfofructo-kinazei-1, astfel inhibă glicoliza. Insulina prin facilitarea descompunerii AMPc, inhibă activitatea proteinkinazei AMPc dependente, favorizează forma defosforilată (activă kinaza / inactivă fosforilaza), creşte concentrația fructoză-2,6-difosfatului, creşte activitatea fosfofructo-kinazei-1 - astfel accelerează glicoliza.

În prezența glucagonului, enzima fructoză-2,6-difosfataza din hepatocite se fosforilează. În consecință, scade cantitatea fructoza-2,6-difosfatului, se inversează raportul dintre cele două enzime cu acțiune opusă (fosfo-fructokinaza / fructoza-2,6-difosfataza), ca urmare, scade intensitatea glicolizei şi porneşte gluconeogeneza. Excesul de glucoză inhibă în primul rând activitatea fosforilazei, stimularea activității glicogen-sintetazei fiind secundară.

7.3.1.3 Piruvat-kinaza

În ficat se găseşte izoenzima L, care este activată de creşterea concentrației glucozei şi de insulină (nu şi în muşchi, unde se află izoenzima M). Piruvat-kinaza este activă în formă defosforilată, glucagonul o inactivează (stimulând fosforilarea enzimei).

7.3.2 Controlul hormonal al nivelului sanguin al glucozei

În mod normal glicemia variază în limite destul de strânse: a jeun 70-99 mg/dL, postprandial 120-140 mg/dL. După mesele bogate în carbohidrați, hiperglicemia determină creşterea captării intrahepatocitare a glucozei, dar influențează şi eliberarea unor hormoni.

Insulina este hormonul hipoglicemiant, iar glucagonul, adrenalina, cortizolul, hormonul de creştere (STH) sunt hormoni contrareglatori (antagonizează efectul insulinei şi sunt gluconeogenetici).

Insulina este un hormon polipeptidic cu 51 aminoacizi, produs de celulele β ale insulelor Langerhans pancreatice. Este alcătuit din două lanțuri (A şi B) legate prin 3 punți disulfurice (inter- şi intracatenare). Insulina este produsă sub formă de pre-proinsulină, care prin scindarea unei porțiuni din lanțul peptidic se transformă în proinsuli-

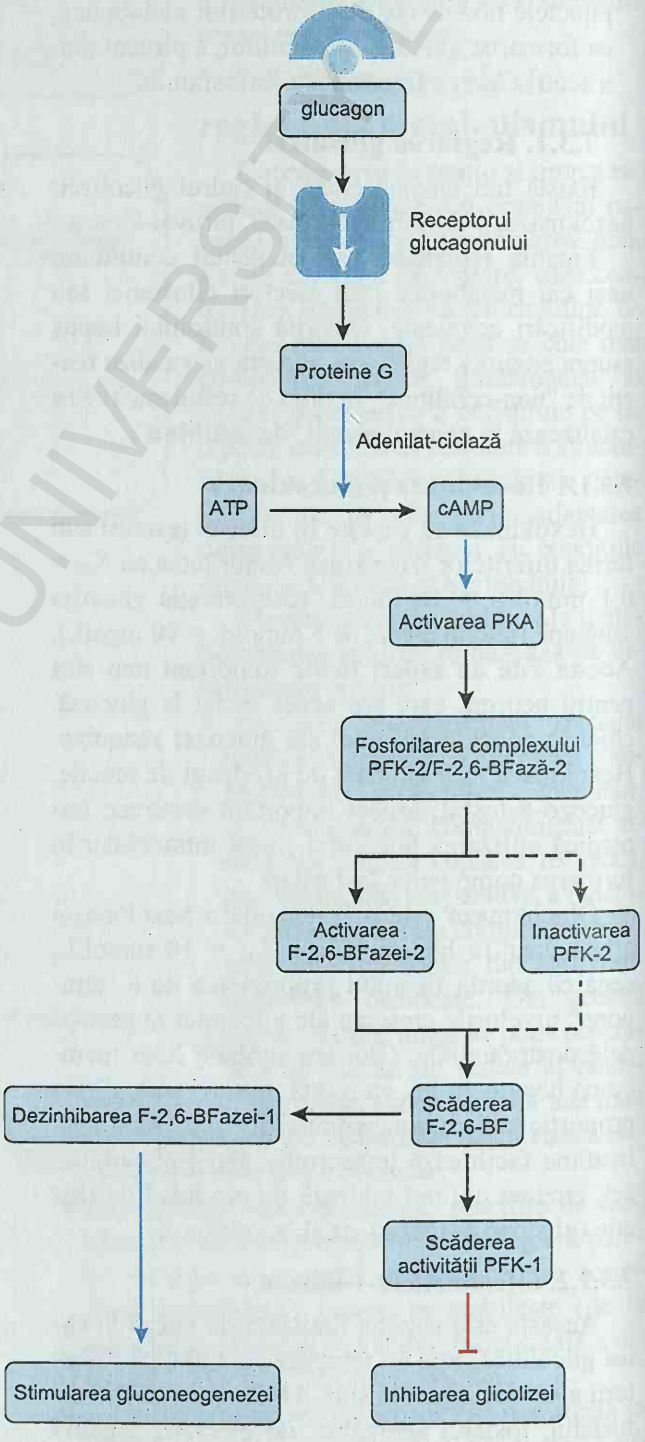


Figura 7.14. Mecanismul de inhibare a glicolizei de către glucagon, prin F-2,6-P_2.

nă. Proinsulina stocată în cisternele aparatului Golgi, are 84 de aminoacizi și este alcătuit din lanțul A (21 aminoacizi), peptidul C (33 Aa) și lanțul B (30 Aa). Clivarea proteolitică a peptidului C între aminoacizii 30 (treonină) și 31 (arginină) determină activarea insulinei. Cantitatea de peptid C este echimolară cu cantitatea insulinei produse, de aceea dozarea peptidului C se poate utiliza pentru a aprecia rezerva secretorie a pancreasului. Peptidul C asigură structura tridimensională și integritatea lanțurilor disulfurice.

Insulina este un hormon anabolic:

- crește captarea glucozei și potasiului în țesutul adipos și muscular;
- stimulează sinteza proteică (crește captarea aminoacizilor în mușchi și ficat);
- facilitează lipogeneza;
- stimulează glicogenogeneza.

Sinteza și secreția insulinei sunt influențate de creșterea concentrației glucozei sanguine, aminoacizilor și GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide sau Glucose-dependent Insulinotropic Peptide – membru al familiei incretinelor). Secreția este bifazică:

- în prima fază (imediată: 5-10 minute) se eliberează aproximativ 2% din cantitatea de insulină, ca urmare a ingestiei de alimente;
- a doua fază (tardivă: ore) are loc pe măsura absorbției glucozei (concertată cu producerea GIP în celulele mucoasei intestinale) și stimularea celulelor β de către glucoză.

Secreția este mai abundentă ca răspuns la testul de încărcare *per os* decât la cel cu administrarea venoasă a glucozei. Explicația acestui fenomen este că hormonii gastro-intestinali, în special GIP (peptidul inhibitor gastric – glucose dependent insulinotrofic peptid), stimulează eliberarea insulinei. Stimularea vagală produce eliberarea insulinei, iar cea simpatică inhibă eliberarea acesteia.

Glucagonul este sintetizat de către celulele α ale insulelor Langerhans. Secreția glucagonului este stimulată de hipoglicemie și aminoacizi gluconeogenetici. Efectele glucagonului sunt: stimularea glicogenolizei hepatice și a gluconeogenezei.

Adrenalina

Hipoglicemia este un potențial stimul pentru secreția adrenalinei. Efectele adrenalinei:

- stimulează glicogenoliza hepatică și musculară;
- inhibă secreția insulinei (crește glicemia);
- stimulează lipoliza și sinteza acizilor grași.

Cortizolul este secretat de către glandele corticosuprarenale. Efectele cortizolului:

- inhibă glicogenoliza hepatică;
- stimulează gluconeogeneza;
- stimulează lipoliza și eliberarea acizilor grași liberi.

Hipoglicemia stimulează secreția **STH (hormonul somatotrop,** hormonul de creștere) de către hipofiză. Efectele STH:

- crește producția hepatică a glucozei;
- scade utilizarea glucozei de către unele țesuturi (posibil datorită lipolizei, cu eliberarea acizilor grași liberi) - unele țesuturi utilizează preferențial acizi grași liberi ca și sursă energetică (de exemplu țesutul miocardic).

7.3.3 Interrelații între metabolismul glucozei, acizilor grași și al corpilor cetonici

Glucoza este o sursă importantă de energie pentru toate țesuturile organismului, în special imediat postprandial și la scurt timp după mese. Hematiile și neuronii consumă 80% din glucoza necesară zilnic în organism (aproximativ 200 g), fiind sursa preferată de energie a acestora. În sânge și interstițiu există doar în jur de 10 g de glucoză (la valorile normale ale glicemiei), de aceea aceasta trebuie suplimentată constant pe măsură ce se consumă. După perioade mai lungi de timp fără alimentație, dacă gluconeogeneza ar fi unica sursă de energie, proteinele organismului ar fi rapid consumate.

Mușchii pot utiliza (țesutul miocardic utilizează chiar preferențial) acizi grași, creierul preferă însă corpii cetonici ca și sursă alternativă de energie. Corpii cetonici (β-hidroxi-butiratul, acetoacetatul și acetona) sunt sintetizați în ficat din Acetil~CoA eliberat din abundență în urma catabolismului acizilor grași.

Cantitatea de acizi grași disponibili pentru țesuturile periferice depinde de rata de eliberare a acestora din țesutul adipos sub acțiunea lipazei hormon sensibile. Insulina are efect inhibitor asupra acestei lipaze, în schimb glucagonul, adrenalina, cortizolul și STH stimulează lipaza hormon sensibilă.

Acizii grași „liberi" circulă de fapt legați de albumină; 30% sunt preluați de ficat și utilizați: prin esterificare se transformă în trigliceride, respectiv prin β-oxidare produc acetil-coenzimă A, care poate intra în ciclul Krebs sau participă la formarea corpilor cetonici - raportul între cele două căi este determinat de raportul insulină/ glucagon.

Dacă raportul insulină/glucagon este mare, acesta facilitează lipogeneza și inhibă lipoliza. Raportul

insulină/glucagon scăzut favorizează activitatea carnitin-palmitoil-transferazei I (transferă acizii grași intramitocondrial), accentuând lipoliza. Fluxul crescut de acizi grași liberi facilitează sinteza corpilor cetonici și duce la abolirea ciclului Krebs.

7.3.4 Reglarea glicemiei, ca un indicator sensibil al reglărilor metabolice

Conținutul în glucoză al sângelui recoltat pe nemâncate este în medie de 80 – 90 mg/dL. În urma unui consum alimentar, această cantitate poate să crească chiar până la valoarea de 10mmol/l (180 mg/dL). Menținerea constantă a glicemiei are o deosebită importanță pentru organism, nu numai din cauza rolului energetic al glucozei, dar și pentru faptul că produșii ei de descompunere funcționează ca substrate ale numeroaselor reacții de biosinteză.

Reglarea glicemiei este realizată de către hepatocite. În urma manifestării hiperglicemiei postprandiale, în celulele țesuturilor periferice, moleculele hexokinazei se saturează cu glucoză, ceea ce duce la reducerea considerabilă a ratei de pătrundere în celule a glucozei. În hepatocite însă, la valoarea postprandială obișnuită a glicemiei, glucokinaza nu este saturată cu glucoză, deoarece are o valoare destul de mare a K_M (10 mmol/L). Din aceasta cauză, glucoză-6-fosfatul se formează în hepatocite mult mai intens în urma creșterii glicemiei din cauza reabsorbției intestinale a glucozei.

Soarta ulterioară a glucozei, de a intra în glicogenogeneză, respectiv glicoliză, lipogeneză sau trans-

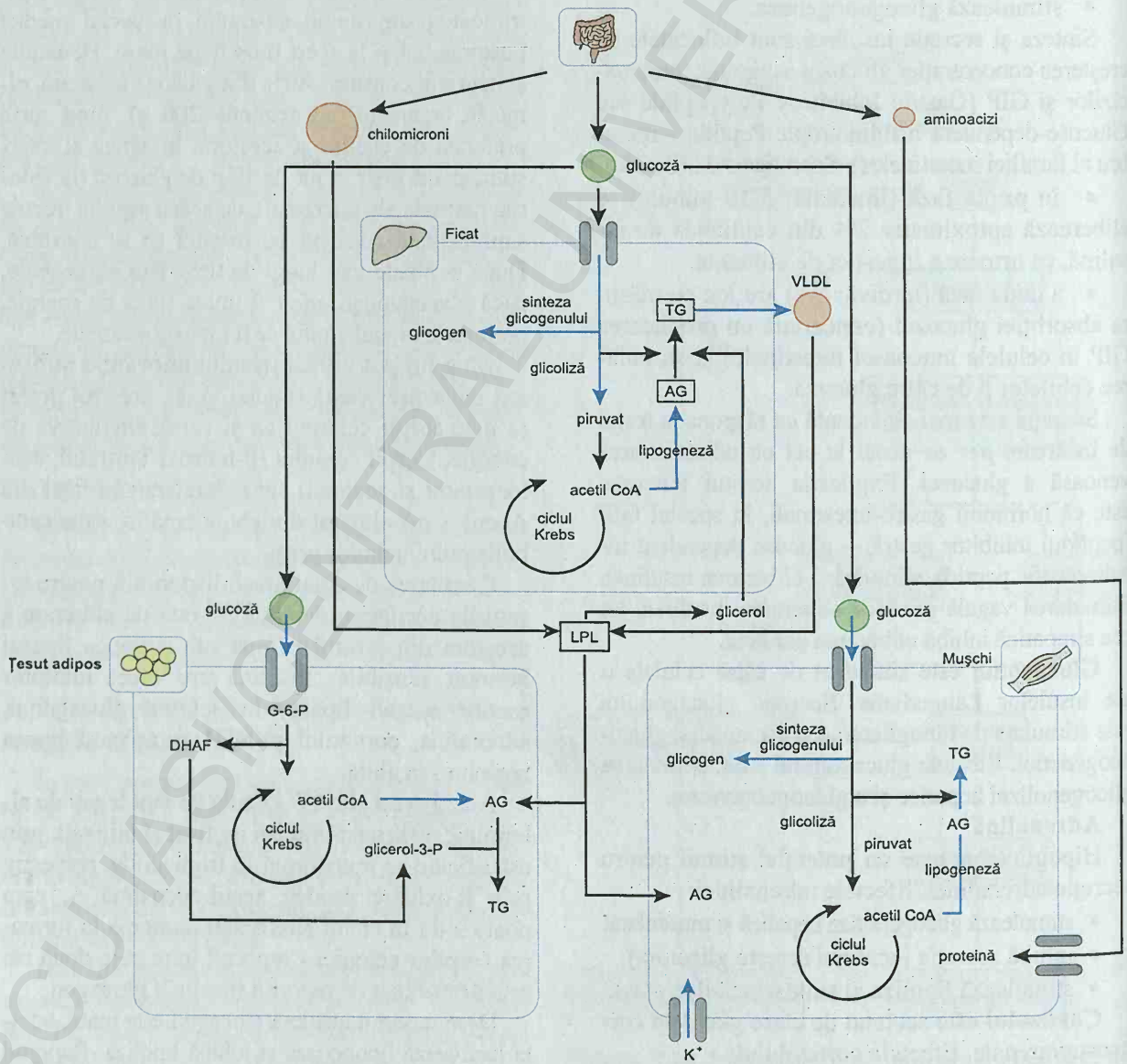


Figura 7.15. Schema metabolismului postprandial – efectele metabolice ale insulinei

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ

formarea ei în unii aminoacizi, este determinată de efectele opuse ale insulinei şi glucagonului. Prin receptorii ei specifici, insulina favorizează pătrunderea glucozei în fibrele musculare striate periferice. Datorită masei musculare consistente, aceasta depozitează o cantitate de aproximativ trei ori mai mare de glicogen, decât ficatul. Totuşi, glicogenul muscular nu poate servi ca sursă de glucoză sanguină, deoarece în fibrele musculare lipseşte glucoză-6-fosfat-fosfataza. Produsul glicolizei, acidul lactic pătrunde însă în sânge şi este transportat la hepatocite, unde un sfert din cantitatea lui totală se oxidează şi pe seama energiei eliberate, restul se retransformă în glucoză. Această cantitate de glucoză se eliberează din nou în sânge de către hepatocite, este captată de fibrele musculare, unde este utilizată sau se redepozitează sub formă de glicogen muscular.

În mod normal homeostazia glucozei sanguine se află sub controlul balanţei Insulină / Glucagon: postprandial (pe perioada absorbţiei principiilor alimentare) aceasta este înclinată în sensul creşterii insulinei şi scăderii glucagonului circulant, iar interprandial (după 6-12 ore de la ultima masă) – în sensul creşterii glucagonului şi scăderii insulinei circulante.

7.3.5 Controlul postprandial al glicemiei

Ingestia de alimente transferă imediat statusul metabolic dinspre catabolism înspre anabolism. Creşterea concentraţiei insulinei stimulează stocarea excesului energetic sub formă de trigliceride, glicogen şi proteine (*Figura 7.15*).

S-a estimat că din 100 g glucoză absorbită 60 g sunt folosite pentru glicogenogeneza hepatică, 25 g intră în ţesuturile dependente de insulină, iar 15 g pătrund în ţesuturile insulino-independente.

Postprandial sunt inhibate glicogenoliza, lipoliza şi proteoliza. Creşterea concentraţiei glucozei plasmatice inhibă acţiunea glucagonului şi acest efect se completează cu creşterea insulinemiei.

Insulina are rolul de a transloca glucoza din spaţiul extracelular spre cel intracelular, spre utilizare directă sau stocare sub formă de rezerve (glicogen, trigliceride, proteine).

În concluzie, glucoza este stocată în momentele de abundenţă energetică sub acţiunea insulinei pentru perioadele cu deficit energetic, când este eliberată de hormoni cu acţiune hiperglicemiantă (glucagonul, adrenalina, cortizolul, tiroxina, hormonul de creştere).

7.3.6 Metabolismul interprandial

Perioada interprandială este caracterizată ca având specific catabolic: rezervele macromoleculare (glicogen, trigliceride) sunt descompuse în fragmente şi particule elementare care ulterior cedează energia lor în procese (lanţuri) oxidative (*Figura 7.16*).

Interprandial concentraţia insulinei este 5-25 μU/ml, secreţia fiind de 0,2-1 U insulină/oră. Această cantitate de insulină este suficientă pentru a menţine un control precis al catabolismului în ţesutul adipos, dar este insuficientă pentru a asigura pătrunderea glucozei în ţesuturile insulino-dependente, astfel glucoza va fi disponibilă pentru ţesutul nervos şi hematii (≈ 10g glucoză / oră). Creşterea concentraţiei glucagonului intensifică glicogenoliza şi gluconeogeneza hepatică, dar şi lipoliza în ţesutul adipos. Astfel se eliberată o cantitate de acizi graşi şi glicerol suficientă ţesutului muscular şi miocardului.

Rezervele energetice ale unui om de 70 kg sunt alcătuite dintr-o cantitate de glicogen echivalentă cu 1.600 kcal, de proteine mobilizabile egale cu 24.000 kcal şi de grăsimi neutre echivalente cu 160.000 kcal. Pentru acoperirea necesarului energetic de 1.600 kcal/zi al unui organism adult în repaus, această cantitate de energie depozitată ar fi suficientă, chiar şi pentru trei luni. În schimb rezervele de glicogen ale organismului se epuizează încă în cursul primei zile de foame, în ciuda faptului că datorită gluconeogenezei glicemia nu coboară sub valoarea de 2,8 mmol/l (50 mg/dL). Celulele cele mai sensibile la hipoglicemie sunt neuronii, care dispun doar de rezerve minime de glicogen. Hipoglicemiile severe (sub 2,5 mmol/L – 45 mg/dL) compromit funcţiile neuronale, conducând la confuzie, dezorientare şi chiar comă severă.

În cursul unei carenţe alimentare de durată, cantitatea de glucoză necesară organelor consumatoare permanente de energie este asigurată prin gluconeogeneză, adică prin transformarea în glucoză a aminoacizilor glucogenetici proveniţi din descompunerea proteinelor proprii. Este de remarcat că la bolnavii cu diabet zaharat insulinodependent neechilibrat, în ciuda valorilor ridicate ale glicemiei, celulele insulinosensibile nu pot prelua glucoza din sânge şi se află într-o stare carenţială de glucoză. Pe termen mai lung, această neoproducţie internă de glucoză, duce la descompunerea proteinelor şi astfel la unele dereglări ireparabile.

Dimensiunile gluconeogenezei sunt condiționate de cantitatea aminoacizilor, proveniți din descompunerea proteinelor. Consumul proteinelor endogene în stările carențiale este contrabalansat prin descompunerea rezervelor grăsoase. Glicerolul eliberat este canalizat spre glicoliză, respectiv spre resinteza grăsimilor, iar acizii graşi liberi spre oxidare şi cetogeneză. Reiese, că în stările carențiale (şi în diabetul zaharat insulinodependent), sursa unică a gluconeogenezei o constituie aminoacizii glucogenetici. Carența alimentară de durată duce la descompunerea proteinelor musculare, cu scăderea treptată a volumului musculaturii. Paralel cu aceasta, creşte din ce în ce mai mult lipoliza şi arderea cetogenetică a acizilor graşi.

Înfometarea de lungă durată este echivalentă cu un status cronic hipoinsulinemic, cu creşterea glucagonului (*Figura 7.17*). Creierul se adaptează prin utilizarea corpilor cetonici ca sursă de energie. Nivelul acizilor graşi liberi circulanți creşte, acidul oxalacetic este orientat spre gluconeogeneză, iar intensitatea ciclului Krebs diminuă; excesul de Acetil~CoA rezultat prin β-oxidarea acizilor graşi, este orientat spre cetogeneză.

7.4 Diabetul zaharat

Diabetul zaharat este o afecțiune cronică care interesează starea de nutriție a întregului organism: ca urmare a deficitului cantitativ sau calitativ de insulină se perturbă metabolismul intermediar al tuturor principiilor alimentare: glucide, lipide, proteine. Afectează 2% din populația țărilor dezvoltate, persoanele respective prezentând un risc de două ori mai mare de a face ateroscle-

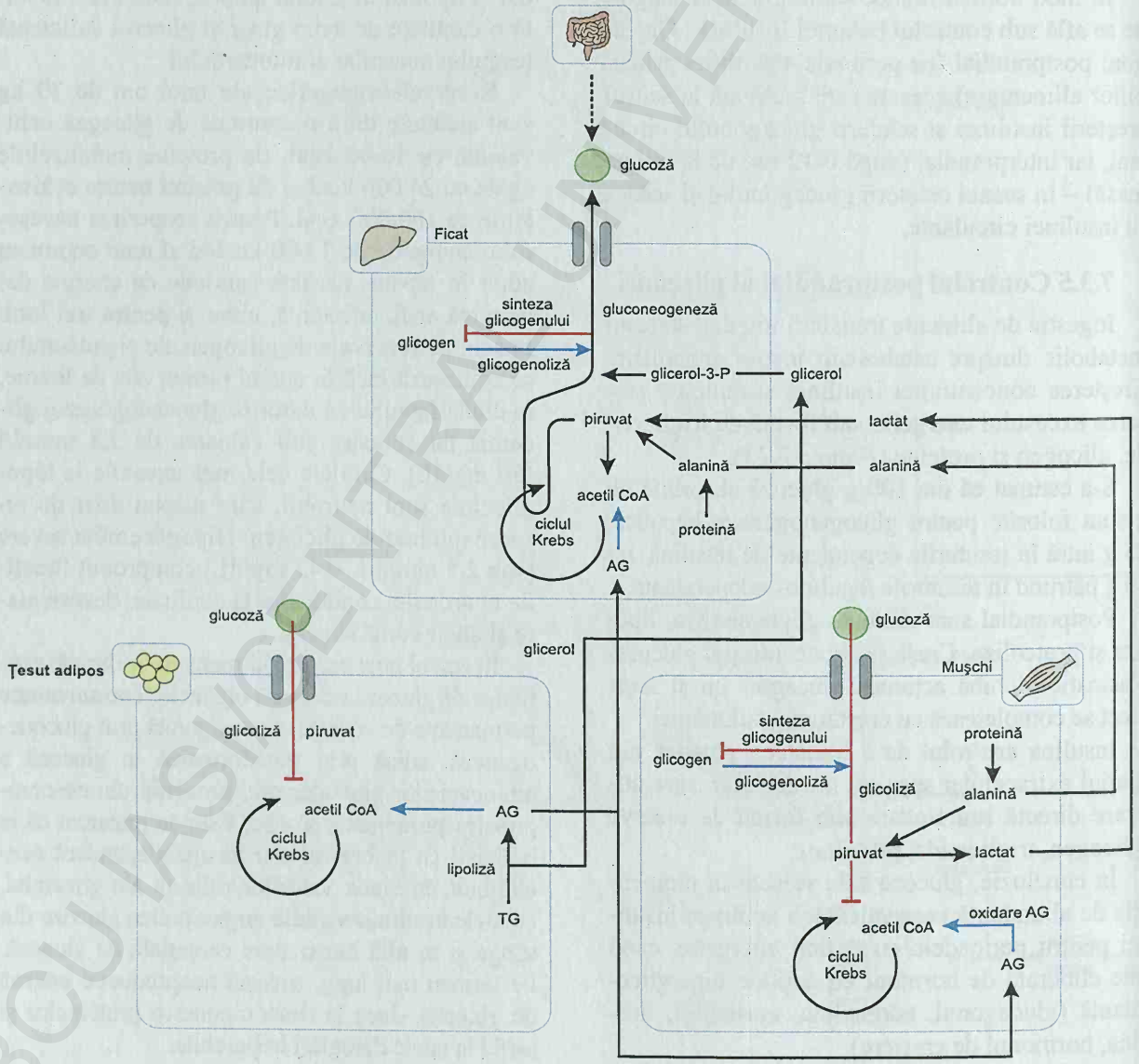


Figura 7.16. Schema metabolismului interprandial precoce

roză coronariană, respectiv de cinci ori mai mare pentru afecțiuni vasculare periferice.

Criteriile de diagnostic ale diabetului zaharat sunt redate în *tabelul 7.II.*

7.4.1 Clasificarea diabetului zaharat

7.4.1.1 Diabetul zaharat tip 1 (DZ tip1)

Diabetul de tip 1 este insulino-dependent, se datorează distrugerii mediate imunologic a celulelor β ale insulelor Langerhans, având drept consecință deficiența de insulină.

În etiologia bolii reacția autoimună este determinată de infiltratul limfocitar Tc la nivelul insulelor Langerhans şi este exprimată prin prezența autoanticorpilor circulanți anti-celule β. Dintre factorii genetici prezintă asociere cu dezvoltarea unui diabet de tip 1, fenotipurile HLA clasa a II-a DR3 şi DR4, dar şi HLA clasa I-a B8 şi B15. Dintre factorii infecțioşi un posibil rol în dezvoltarea bolii îl au infecțiile cu virusul Coxsackie B1 şi B4, respectiv virusul oreionului (parotiditei epidemice).

Boala debutează de obicei în copilărie / adolescență, cu poliurie, polidipsie, polifagie, scădere în greutate, oboseală şi frecvent cu cetoacidoză. Simptomatologia se datorează hiperglicemiei care cauzează diureză osmotică, manifestându-se prin poliurie (1 mol glucoză are 180 g şi necesită minimum 1000 ml apă pentru eliminare). Pierderea unui volum mare de apă pe cale urinară cauzează senzația de sete şi polidipsia (consumul unei mari cantități de lichide). Glucoza fiind un combustibil important, pierderea sa se compensează prin polifagie (ingerarea unor cantități mari de alimente).

7.4.1.2 Diabetul zaharat tip 2 (DZ tip 2)

Diabetul zaharat tip 2 s-a numit în trecut diabet zaharat non - insulinodependent (NIDDM).

OMS clasifică această patologie în diabet zaharat tip 2 apărut la persoane obeze şi non-obe-

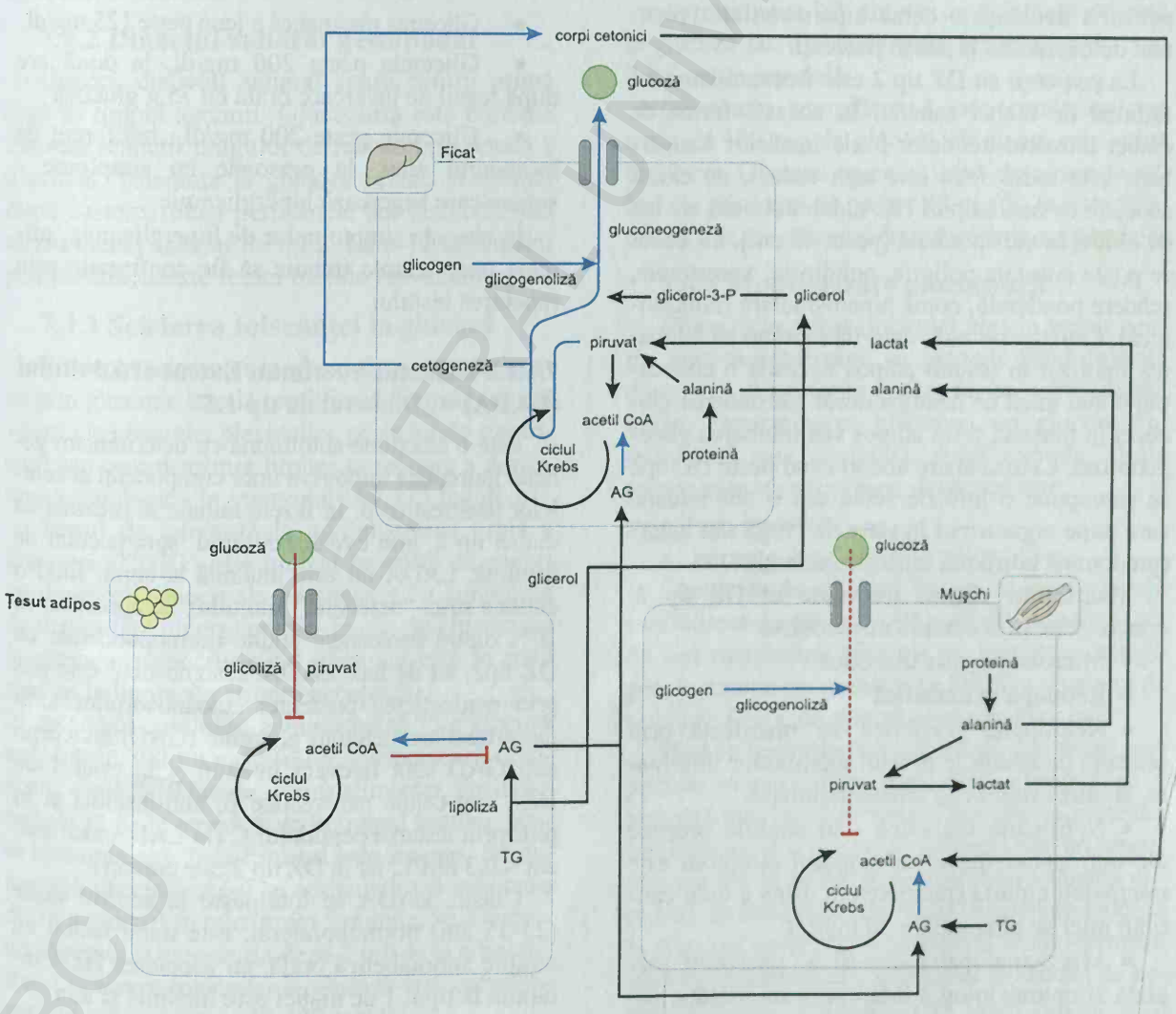


Figura 7.17. Schema metabolismului în diabet zaharat

ze. Deficiența se află la nivelul producerii/ secreției insulinei și la nivelul acțiunii ei asupra organelor țintă (rezistență la insulină).

Cauza acestei rezistențe la insulină poate fi:

- sinteza unui hormon inadecvat din punct de vedere structural;
- existența unor anticorpi antiinsulină care blochează hormonul;
- scăderea numărului receptorilor membranari funcționali pentru insulină la nivelul celulelor periferice din cauza unor anticorpi blocanți ai acestor receptori, sau datorită scăderii sintezei receptorilor insulinici;
- defect funcțional postmembranar datorită deficitului de mesager secund.

Factorii determinanți ai rezistenței pentru insulină sunt de natură genetică, obezitatea, vârsta; diverse condiții stresante (infecții, infarct miocardic acut, colecistite, pneumonii, fracturi, etc) se pot asocia cu o rezistență la insulină suficientă pentru a declanșa o comă hiperosmolară (eventual cetoacidoză) la acești pacienți.

La pacienții cu DZ tip 2 este frecvent istoricul familial de diabet zaharat. În această formă de diabet numărul celulelor β ale insulelor Langerhans este redus (sau este ușor redus), nu există asociere cu unele tipuri HLA, debutul bolii are loc de obicei la vârsta adultă (peste 40 ani). La debut se poate constata poliurie, polidipsie, xerostomie, scădere ponderală, comă hiperosmolară (noncetonică). Cetoza este rară, datorită faptului că inhibarea lipolizei în țesutul adipos necesită o concentrație mai mică de insulină decât pătrunderea glucozei în mușchi, țesut adipos sau inhibarea glicogenolizei. Cetoza apare uneori când peste DZ tip2 se suprapune o infecție acută sau o altă situație care pune organismul în stare de "fugă sau luptă" (predomină hormonii hiperglicemianți).

Manifestări clinice frecvente în DZ tip 2, concretizate prin complicații cronice:

- Microangiopatia diabetică
- Retinopatia diabetică
- Neuropatia periferică se manifestă prin senzația de arsură la nivelul membrelor inferioare, abolirea reflexelor osteotendinoase;
- Nefropatia diabetică - în stadiile precoce ale nefropatiei diabetice singurul simptom este microalbuminuria (pierderea în urină a unor cantități mici de albumină ≈ 30 mg/L).
- Macroangiopatia diabetică: pacientul prezinta simptomatologia infarctului miocardic, accidentelor vasculare cerebrale sau ale arteriopatiilor periferice
- Vaginita cu *Candida albicans* - aproximativ o treime din femeile cu această afecțiune sunt diabetice;
- Miopia (focalizarea razelor luminoase înaintea maculei retinei) se datorează creșterii hidratării cristalinului prin depunerile compușilor polihidroxilici;
- Furunculoza și în general stafilocociile cutanate, sunt frecvente;
- Sindromul de "tunel carpian" apare prin compresia nervului median.

Pentru 2010, Asociația Americană de Diabet (ADA) a revizuit criteriile de diagnostic ale diabetului zaharat de tip 2, promovând hemoglobina A1c ca test diagnostic mai rapid, mai ușor de utilizat și care poate reduce numărul pacienților cu prediabet nediagnosticați. Astfel, noile criterii diagnostice sunt:

- Hemoglobina A1c peste 6,5%
- Glicemia plasmatică a jeun peste 125 mg/dL
- Glicemia peste 200 mg/dL la două ore după testul de încărcare orală cu 75 g glucoză
- Glicemie peste 200 mg/dL, indiferent de momentul zilei, la persoane cu simptome / semne care sugerează hiperglicemie

În absența simptomelor de hiperglicemie, primele trei variante trebuie să fie confirmate prin repetarea testului.

7.4.1.3 Diabetul Autoimun Latent al Adultului (LADA) – „Diabetul de tip 1.5"

Este o afecțiune autoimună cu determinism genetic îndreptată împotriva unor componenți ai celulelor pancreatice β. În fazele inițiale se prezintă ca diabet tip 2, însă evoluează rapid spre necesar de insulină. LADA nu este întâlnită la copii, fiind o entitate strict "rezervată" adultului. Se apreciază că 10% dintre persoanele adulte normoponderale cu DZ tip2, au de fapt LADA. Diagnosticul este pus prin evidențierea prezenței autoanticorpilor anti-Decarboxilaza acidului glutamic (GAD; anticorpii anti GAD sunt frecvent întâlniți și în tipul 1 de DZ), anti-celule pancreatice β, anti-insulină și în plus prin testarea peptidului C (în LADA este scăzut < 0,3 nM/L, iar în DZ tip 2 este crescut).

Clasic, LADA se întâlnește la adultul tânăr (25-35 ani) normoponderal, este tratat inițial cu terapie antidiabetică orală, iar asocierea HLA întâlnită la tipul 1 de diabet este întâlnită și aici.

Tabel 7.II. Criterii ADA (2010) de diagnostic ale DZ în funcție de glicemie

	Glucoza plasmatică
Diabet zaharat	
• înaintea testului	> 125 mg/dL
• după 2 ore	> 200 mg/dL
Toleranță scăzută	
• înaintea testului	100-125 mg/dL
• după 2 ore	140-200 mg/dL
Normal	
• *à jeun*	< 100 mg/dL

7.4.1.4 Diabet zaharat secundar (diabetul zaharat asociat cu alte boli)

Afecțiuni cum ar fi pancreatita cronică, tumori, endocrinopatii, hemocromatoza, diverse medicamente, infecții, pot determina apariția unui diabet secudar.

7.4.2 Diabetul zaharat gestațional

Uneori, diabetul zaharat apare pentru prima dată în timpul sarcinii. Glucozuria este comună datorită scăderii pragului de reabsorbție renală a glucozei. Toleranța la glucoză revine la normal după naștere, totuși persoanele pot dezvolta mai târziu diabet zaharat de tip 2. La 6-12 săptămâni postpartum, aceste femei trebuie reevaluate.

7.4.3 Scăderea toleranței la glucoză

Scăderea toleranței la glucoză se caracterizează prin glicemie bazală modificată (în mod repetat valori ale glicemiei plasmatice peste limita superioară sau ușor deasupra limitei superioare a domeniului fiziologic - în intervalul 100-125 mg/dL).

Testul de toleranță la administrarea orală a glucozei (TTOG) este indicat în astfel de cazuri cu diagnostic incert (la persoanele cu simptome de diabet fără hiperglicemie, în caz de glucozurie la gravide, respectiv când glicemia este în mod repetat la limita superioară acceptată).

În cadrul testului se administrează 75 g glucoză anhidră, în 300 ml apă. Testul se efectuează dimineața, după 8-10 ore de repaus alimentar. Pacientul trebuie să fie în repaus fizic în timpul testului, poate consuma apă, însă fumatul este interzis. Se determină glicemia. Apoi se administrează cantitatea de 75 g glucoză în maximum 5 minute. Se determină glicemia și glucozuria după 2 ore de la administrare. Scăderea toleranței la glucoză este caracterizată de glicemii între 140-199 mg/dL.

Factori care pot influența testul:

• Dieta anterioară: trebuie să fie "normală" 3-4 zile înainte (pacientul trebuie să consume 200-250 g glucide/zi). Testul iese pozitiv dacă pacientul a consumat un regim hipocaloric.

• Perioada din zi: testul se face dimineața, deoarece glicemia este ceva mai mare în restul zilei.

• Medicație: diureticele tiazidice, β-blocantele, fenitoinul și steroizii pot cauza scăderea toleranței la glucoză.

Estimarea glicemiei

Numeroși factori pot influența valoarea glicemiei. Există diferențe între sângele venos și capilar (glicemia este mai mare în sânge capilar), în sânge este mai mică decât în plasmă (datorită faptului că volumul de distribuție al glucozei în sânge este mai mare din cauza hematiilor).

Separarea sângelui de plasmă trebuie să se facă rapid, sau trebuie folosit un anticoagulant care blochează glicoliza în hematii (NaF).

Aproximativ 1/3 din cei cu toleranță scăzută la glucoză fac diabet zaharat, respectiv 1/3 revin la toleranța normală.

Glicozurie semnificativă este cantitatea mai mare de 100 mg de glucoză eliminată prin urină în 24 ore. Glucoza apare în urină de obicei la valori ale glicemiei de peste 180 mg/dL (acesta fiind considerat pragul renal de reabsorbție a glucozei).

7.4.4 Monitorizare biochimică

Glucozuria a fost utilă mai ales în trecut pentru auto-monitorizare, în prezent fiind folosită doar dacă din diferite cauze, nu se poate recolta sânge. Determinarea glicemiei cu glucometrul individual este preferată, fiind metoda ideală pentru auto-monitorizare, deoarece este:

- mai igienică;
- permite decelarea hipoglicemiilor.

Glucometrele utilizând testele de chimie uscată sunt extrem de utile datorită posibilității bolnavului de a-și monitoriza glicemia pe parcursul întregii zile, în funcție de modificarea dietei, a nivelului de activitate fizică, de apariția unor patologii noi.

HbA1c hemoglobina glicozilată este testul care permite monitorizarea controlului glicemic pe o perioadă mai lungă de timp. Glicozilarea proteinelor (între acestea și a hemoglobinei) este un proces care are loc în sânge proporțional cu valoarea glicemiei. În cadrul procesului de glicozilare glucoza se atașează neenzimatic la capătul amino-terminal (valinei terminală) din lanțul β al moleculei de hemoglobină, se formează o bază Schiff care în etapa

următoare se transformă în compus Amadori stabil. Hemoglobina este preferată altor proteine pentru că are un timp de înjumătățire lung. Albumina are timpul de înjumătățire de 20 zile.

În mod normal maximum 5% din hemoglobină este glicozilată. HbA1c este un parametru foarte util datorită timpului de înjumătățire lung al hemoglobinei (60 zile), astfel poate da informații asupra controlului glicemiei pentru o perioadă anterioară mai lungă de timp, spre deosebire de valoarea glicemiei, care reflectă doar situația din momentul recoltării. Valori între 5,7-6,4 % indică prediabetul, iar valori peste 6,5 % pun diagnosticul de diabet. Valori sub 7% la diabetici, arată un control bun al glicemiei.

Tipuri de Hb: HbA0 este hemoglobina normală preponderentă a adultului, cu formula $\alpha_2\beta_2$; HbA1 este fracțiunea glicozilată totală, din care 80% este HbA1c, iar restul se formează prin glicozilarea altor resturi aminice din structura lanțului globinic, decât cea a valinei N-terminale a lanțului β; HbA2 este compusă din lanțurile $\alpha_2\delta_2$, respectiv hemoglobina fetală (HbF) are structura $\alpha_2\gamma_2$.

Concentrația insulinei se situează între 5-25 μU/ml, valoarea poate fi mai crescută în tipul 2 de diabet (cel puțin în fazele incipiente).

Concentrația peptidului C (0,4-2 ng/ml; 0,3-1,5 nM/L), este un indicator mai bun pentru producția endogenă de insulină (mai ales în cazurile cu anticorpi anti-insulină, care blochează hormonul).

7.4.5 Hiperlipoproteinemiile la persoanele cu diabet

Apar de obicei dislipidemii mixte, cu creșterea trigliceridelor și a colesterolului. Cauze:

- lipoliza accentuată în țesutul adipos duce la creșterea nivelului acizilor grași liberi, se intensifică sinteza hepatică a trigliceridelor, care apoi sunt înglobate în particulele VLDL;
- scăderea activității lipoprotein lipazei (insulina fiind un activator al LPL).

La cei cu diabet zaharat de tip 1 crește fracțiunea HDL-colesterolului, totuși nu protejează împotriva aterosclerozei (datorită apoproteinelor glicozilate, rapid epurate), deoarece scade subclasa HDL3 (protectoare). În diabetul zaharat de tip 2 scade HDL-colesterolul.

7.4.6 Complicațiile diabetului

Complicațiile imediate cele mai frecvente sunt hipoglicemia, cetoacidoza diabetică, coma hiperosmolară noncetonică (rar) și acidoza lactică (foarte rar).

Complicațiile tardive (cronice) sunt:

a. Microangiopatia diabetică:

- retinopatia diabetică duce la scăderea până la pierderea vederii
- nefropatia diabetică - progresia leziunii vaselor sanguine renale duce la instalarea insuficienței renale, fiind necesară instituirea dializei sau realizarea transplantului renal
- neuropatia diabetică duce la scăderea sensibilității tactile, termice și dureroase în special la nivelul membrelor inferioare (laba piciorului si gambele). Neuropatia se poate instala și la nivelul unor nervi implicati în controlul funcțiilor organismului conducând la modificări ale digestiei și ale funcției sexuale.

b. Macroangiopatia diabetică: cardiopatie ischemică, angiopatia diabetică periferică sau cerebrală.

c. Altele: îngroșare tegumentară, cataractă.

7.4.6.1 Cetoacidoza diabetică (CAD)

Înainte de accesibilitatea terapiei cu insulină, CAD era responsabilă pentru 70% din decesele bolnavilor diabetici (actualmente, mai puțin de 7% din diabetici mor în CAD).

CAD se datorează unor situații care cresc necesarul de insulină (stres acut, infecții, alte afecțiuni majore), deoarece cresc eliberarea hormonilor contrareglatori/ hiperglicemianți. Întreruperea tratamentului diabetic sau scăderea dozele de insulină chiar în timpul acestor episoade, agravează starea bolnavului. În acest sens este foarte importantă educația specifică a pacienților cu diabet.

Sub acțiunea intensificată a hormonilor hiperglicemianți, crește rata glicogenolizei și gluconeogenezei, cu eliberarea unor cantități mai mari de glucoză la nivel hepatic. Astfel crește glicemia, preluarea țesuturilor mari consumatoare (hepatic, adipos) fiind mai mică (datorită nivelului scăzut al insulinei). Hiperglicemia se datorează în primul rând eliberării crescute și neosintezei hepatice de glucoză și abia apoi preluării scăzute a glucozei în țesuturile insulino-dependente. Crește osmolaritatea plasmei, ceea ce provoacă deshidratare celulară și sete. Glucozuria provoacă poliurie prin diureză osmotică și interferă cu reabsorbția tubulară a Na^+, H_2O, K^+. Se intensifică lipoliza datorită scăderii insulinei, crește nivelul acizilor grași liberi, care iau parte la procesul de β-oxidare hepatică. Din excesul de Acetil-CoA eliberat se formează corpi cetonici, care duc la acidoză metabolică. Crește con-

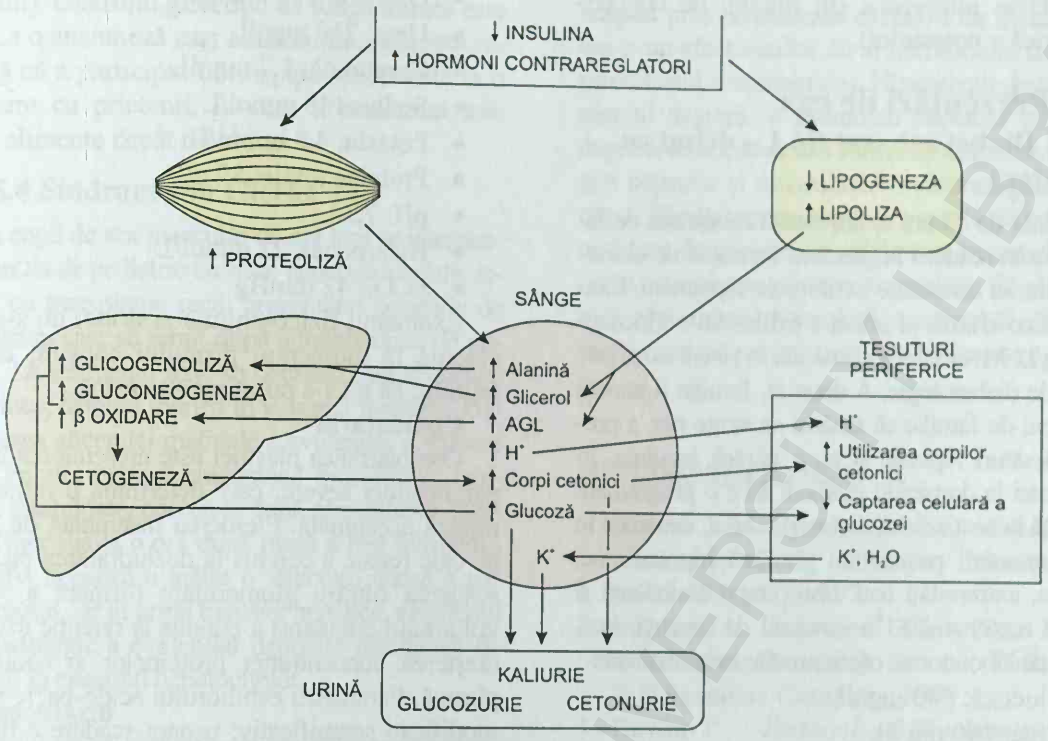


Figura 7.18. Dezechilibrul metabolic din coma acido-cetozică

centrația protonilor, care intră în celule în schimbul ionilor de K^+: apare o hiperpotasemie temporară, după care excesul se elimină pe cale urinară (*Figura 7.18*). Creșterea concentrației protonilor (scăderea pH-ului), care traversează bariera hematoencefalică, provoacă hiperventilație (respirație Küssmaul).

Caracteristici clinice:

- bolnav semiconștient, cu respirație Küssmaul și miros de acetonă;
- poliurie, polidipsie;
- oboseală;
- vomă, greață;
- deshidratare, hipotensiune, tahicardie;
- tegumente calde, eritematoase, piele uscată;
- istoric recent de infecție.

Investigații: glicemie, uree, ionograma (potasemie), corpi cetonici (acidul acetoacetic reacționează cu nitroprusiatul de sodiu, dar nu se poate detecta astfel acidul β hidroxibutiric, care se formează în fazele inițiale ale bolii), parametri echilibrului acido-bazic, fosfatul anorganic.

Tratament:

- lichide izotone;
- insulină bolus inițial 0,15 U/kgc, apoi 0,1 U/kgc/oră (doza trebuie crescută dacă la două ore glicemia nu se remediază);
- suplimentarea K^+, în funcție de concentrația acestui ion;
- uneori administrare de bicarbonat (HCO_3^-), în funcție de BE.

7.4.6.2 Coma hiperosmolară

Raționamentul pentru care unii pacienți fac comă cetoacidozică, iar alții comă hiperosmolară nu este pe deplin cunoscut.

Diferențe majore față de coma cetoacidozică:

- osmolaritatea serică este foarte crescută: 350-400 mOsm/kg;
- glicemia este peste 600 mg/dL;
- persoanele în cauză sunt vârstnici, cu simptomatologie anterioară lungă, 95% cu DZ tip 2.

Caracteristici clinice:

- deshidratarea este semnul major, evidentă la nivelul tegumentelor și mucoaselor;
- datorită hipovolemiei, se constată hipotensiune ortostatică și puls slab, tahicardic.

Investigații:

- glicemia este foarte crescută (peste 600 mg/dL);
- pH-ul este normal sau aproape de normal;
- bicarbonatul seric este peste 15 mEq/L
- osmolaritatea crescută (peste 320mOsm/L): $mOsm/L = 2([Na^+] + [K^+]) + [G]/18 + [Ureea]/6$.

Tratament:

- lichide izo/hipotone (NaCl 0,9%, sau 0,45% dacă osmolaritatea este peste 350 mOsm/ml);
- insulină: 0,15 U/kgc, apoi 0,1 U/kgc/oră;

• potasiu intravenos (în funcție de concentrația serică a potasiului).

7.5 Prezentări de caz

7.5.1 Diabet zaharat tip 1 – debut cu cetoacidoză

Un tânăr de 17 ani se adresează medicului de familie datorită scăderii în greutate, senzației de oboseală și poliuriei constatate în ultimele săptămâni. Examenul fizico-chimic al urinei a evidențiat o glucozurie de 2 g/L. Medicul îi recomandă să se adreseze serviciului de diabetologie. A doua zi, familia îl anunță pe medicul de familie că tânărul se simte rău, a prezentat vărsături repetate și nu a părăsit locuința. În urma vizitei la domiciliu medicul face o programare de urgență la secția de diabet a spitalului, deoarece în urma examinării pacientului constată hipotensiune, tahicardie, extremități reci, transpirație abundentă și respirație acetonemică. În serviciul de urgență, examinările de laborator au oferit următoarele rezultate:

- Glucoză: 540 mg/dL
- Uree: 100 mg/dL
- Creatinină: 1,6 mg/dL
- Sodiu: 129 mmol/L
- Potasiu: 5,9 mmol/L
- pH: 7,04
- Bicarbonat: 6 mmol/L
- pCO_2: 20 mmHg

Comentariu

Aspectul clinic și paraclinic indică o cetoacidoză diabetică tipică: pacientul are un exces de protoni semnificativ (91 nM/L), cu compensare respiratorie parțială; hipotensiunea, tahicardia, transpirația și hiponatremia sugerează o depleție de fluide severă în spațiul extracelular; hiperpotasemia se datorează pe de o parte redistribuției între spațiile intra-extracelular, pe de altă parte – scăderii eliminării renale, urmare a dezhidratării severe (confirmată și de creșterea neproporțională a concentrațiilor creatininei și ureei, a celei din urmă și datorită metabolizării excesive a aminoacizilor). Pacientul este hiperglicemic, iar prezența corpilor cetonici în urină poate fi confirmată de examenul fizico-chimic al acesteia.

7.5.2 Comă hiperosmolară la o pacientă cu diabet zaharat tip 2

O femeie de 59 de ani cu diabet zaharat tip 2 care locuiește singură, a fost găsită de fiul ei acasă, în stare de semiconștiență. Consultul efectuat la serviciul de urgență a evidențiat o pacientă dezhidratată, oligurică, cu următoarele rezultate de laborator:

- Glucoză: 900 mg/dL
- Uree: 210 mg/dL
- Creatinină: 1,7 mg/dL
- Sodiu: 148 mmol/L
- Potasiu: 4,6 mmol/L
- Proteine totale: 89 g/L
- pH: 7,34
- Bicarbonat: 22 mmol/L
- pCO_2: 42 mmHg

Examenul fizico-chimic al urinei nu s-a putut efectua la momentul primului consult, datorită faptului că nu s-a putut recolta urină.

Comentariu

Osmolaritatea plasmei este crescută datorită hiperglicemiei severe, care determină o diureză osmotică accentuată. Pierderea însemnată de lichide pe cale renală a condus la dezhidratarea pacientei; scăderea filtrării glomerulare (urmare a scăderii volumului circulant) a condus la retenție azotată și creșterea concentrației proteinelor și sodiului în plasmă. Parametrii echilibrului acido-bazic nu sunt modificați semnificativ; ușoara scădere a bicarbonaților se poate datora filtrării renale reduse. După o oră de la admiterea în spital a pacientei și administrarea parenterală de lichide și insulină, examenul de urină efectuat nu a evidențiat corpi cetonici, deși glucozuria a fost peste 4 g/L.

Hiperglicemia severă non-cetonemică apare doar în diabetul tip 2; substratul este acela că pentru prevenirea unei lipolize excesive este suficientă o cantitate minimă de insulină (pentru a contracara efectul cetogenetic al glucagonului), mult mai mică decât aceea necesară pentru pătrunderea glucozei în celula musculară și adipoasă.

7.5.3 Diabet zaharat echilibrat, cu hiperglicemie severă tranzitorie

O tânără cu diabet zaharat tip 1, cunoscută și tratată de 2 ani, se prezintă în serviciul ambulator pentru controlul periodic, fără să relateze nimic semnificativ clinic de la ultima vizită. Nu și-a autoverificat în ultima lună glicemia, datorită faptului că nu îi face plăcere să se înțepe pentru determinarea din sânge capilar. Investigațiile efectuate cu ocazia consultului au dat următoarele rezultate:

- Glicemia (la 2 ore după micul dejun): 300 mg/dL
- Glucozurie: 10 g/L
- HbA1c: 6,3%

Comentariu

În ciuda hiperglicemiei și a glucozuriei severe (însoțite aparent de un dezinteres în monitoriza-

rea bolii), controlul glicemic de lungă durată este bun. La o anamneză mai amănunțită, pacienta relatează că a participat în noaptea precedentă la o petrecere cu prietenii, la care a consumat mai multe alimente decât de obicei.

7.5.4 Sindrom von Gierke

Un copil de sex masculin de opt luni se internează în secția de pediatrie cu stare generală alterată, letargic, cu transpirație rece, prezentând perioade de iritabilitate, care se remit după administrarea de alimente. La examenul fizic se decelează un abdomen voluminos, datorită măririi în volum a ficatului. Determinarea glicemiei matinale a evidențiat o valoare de 41 mg/dL, copilul prezentând transpirație, tahicardie, iritabilitate, corectate după alimentarea copilului. Glicemia la o oră după masă a fost 69mg/dL. Ecografia hepatică a arătat o structură densă a parenchimului, iar în urma biopsiei hepatice, examenul morfopatologic a evidențiat depozite însemnate de glicogen în citosolul hepatocitelor.

Comentariu

Copilul are un deficit sever de eliberare a glucozei din depozitele de glicogen hepatice. Severitatea hipoglicemiei se datorează cel mai probabil deficitului de G-6-fosfatază (necesară pentru eliberarea glucozei din hepatocit, fie că G-6-P provine din glicogenoliză, fie din gluconeogeneză). Testele de biologie moleculară au confirmat o deficiență de tip Ia (80% dintre cazurile de glicogenoze von Gierke se datorează deficitului de G-6-P Hidrolază, restul – tipul Ib – deficitului de transportor de G-6-P). Remediul terapeutic constă în mese ușoare, dar frecvente cu carbohidrați complecși cu absorbție lentă din tubul digestiv; la copilul mic, alimetația pe parcursul nopții este de asemenea importantă.

7.5.5 Nou-născut macrosom cu mamă diabetică

În urma unei sarcini cu un control precar al glicemiei la o femeie cu diabet, se naște un copil de sex masculin cu greutatea de 5,1 kg. La scurt timp după naștere, copilul prezintă semne de hipoglicemie severă (este iritabil, cu transpirații reci, tahicardic), corectate prin administrare de soluție de glucoză.

Comentariu

Copilul a venit în contact cu un mediu hiperglicemic în viața intrauterină; organismul fătului s-a adaptat prin producerea excesivă de insulină, care are și un efect similar cu al hormonului de creștere (producând macrosomia). Hiperinsulinemia la momentul nașterii, a promovat captarea glucozei și depunerea acesteia sub forma de depozite de glicogen hepatice și musculare cu sistarea gluconeogenezei. Hipoglicemia acută se corectează prin administrarea de glucoză, în zilele următoare însă, acest lucru nu mai este necesar, depozitele de glicogen și mai ales masa musculară consistentă, furnizând materia primă pentru susținerea glicemiei.

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.143-187, p.273-297.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Devlin T. – *Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, p.237-358.
4. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991, p.127-142.
5. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996, p.1-21.
6. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry,* Ed.5, Mosby, 2004, p.191-217.
7. Mayne P.D. – *Clinical Chemistry in diagnosis and treatment,* Ed 6., Arnold, 1994, p 195-222.
8. Mihele Denisa – *Biochimie Clinică,* Ed. Medicală, 2001.
9. Nelson D., Cox M. – *Lehninger Principles of Biochemistry,* Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005, p. 293-321.
10. Pagana Kathleen, Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 222-223, p.267-284.
11. Smith Colleen, Marks A., Lieberman M.– *Marks' Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach*, Ed.2, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 3-38, p.477–541.

BCU CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 8.
Metabolismul lipidelor/ lipoproteinelor şi ateroscleroza

Minodora Dobreanu

8.1 Lipidele

Lipidele sunt un grup heterogen de compuşi chimici, insolubili în apă, dar solubili în solvenţi organici apolari (cloroform, tetraclorură de carbon benzen), cu rol energetic (TG, AGL), structural (fosfolipidele) sau funcţional (acizi biliari, hormoni steroizi, prostaglandine/ leucotriene etc).

Lipidele sunt combinaţii ale acizilor graşi (AG) cu alcooli sau amine. Ele reprezintă 15-20% din masa corporală a unui adult normal conformat. Grupa mare a lipidelor cuprinde două categorii mari de substanţe: lipidele simple şi lipidele compuse.

Lipidele simple, din punct de vedere chimic, sunt esterii unor alcooli mono- sau polivalenţi formaţi cu acizi graşi lungi catenari (saturaţi sau nesaturaţi) cu un număr par de atomi de carbon. Prototipul lor îl constituie trigliceridele (grăsimile neutre), în care un alcool trivalent (triol: glicerol) este esterificat cu 3 molecule de acizi graşi.

Lipidele compuse conţin în afara glicerolului şi alţi alcooli: inozitol (în inozitolfosfatide) sau sfingozină (în sfingomieline), dar şi fosfaţi (în fosfolipide) şi glucide (în cerebrozide şi gangliozide). Grupa steroizilor cuprinde colesterolul şi derivaţii săi (acizii biliari, hormonii steroizi şi sexuali), reprezentanţi importanţi ai biostructurilor purtătoare de semnale biologice (hormoni).

8.1.1 Lipidele serice

Concentraţia totală este de 8-12 g/l. **Clasele** majore de lipide serice sunt următoarele:

a. ***Colesterolul*** - alcool policiclic (conţine 27 atomi de carbon, greutate moleculară 386 D), având ca structură de bază nucleul steranic, cu o grupare -OH la C3 şi o catenă ramificată, apolară, la C17 - este componentul de rezistenţă al membranelor celulare, al substanţei nervoase, precursorul acizilor biliari, hormonilor steroizi, vitaminei D etc. Nivelul fiziologic în ser este de 120 - 200 mg/dL (3 - 5,17 mM), din care 2/3 este esterificat (CE - intens hidrofob), iar 1/3 liber (CL - slab hidrofil); colesterolul plasmatic este de origine alimentară (aproximativ 0,5g/zi) şi endogenă (aproximativ 1g/zi). Metabolismul colesterolului este important în etiopatologia bolilor cardiovasculare şi în patologia hepato- biliară.

b. ***Trigliceridele*** (TG) sunt structuri puternic hidrofobe - triesteri ai glicerolului cu acizi graşi. Au rol în stocarea şi transportul energiei într-o formă eficientă, fără apă şi cu putere calorică ridicată: dacă aceeaşi cantitate de energie stocată în ţesutul adipos al unui adult de 70 kg ar fi stocată sub formă de glicogen, organismul ar cântări 210 kg. Concentraţia lor serică este de 100 - 200 mg/dL (1,1 - 2,2 mM). La un individ adult cu o dietă medie, sunt transportate în plasmă, zilnic, 100-150 g TG, din care 70-100 g provin din alimentaţie (TG exogene) şi 30-60 g din sinteza endogenă (TG endogene).

c. ***Fosfolipidele*** sunt substanţe amfipatice (au o moleculă bipolară), esteri ai acidului fosfatidic cu aminoalcooli, aminoacizi alcooli ciclici. Sunt componentele principale ale membranelor celulare (dublu strat fosfolipidic cu proteine înglobate) şi ale lipoproteinelor (participă la solubilizarea lipidelor apolare în ser), mesageri secundari (fosfatidilinozitol 4,5-difosfat) în transmiterea informaţiilor din mediul extern celular la efectorii in-

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

tracelulari, markeri de suprafaţă celulară (glicolipide), promotori ai procesului de coagulare (Factor plachetar 3, Factorul tisular – factorul III al coagulării, în denumirea anterioară), catalizatori ai digestiei şi absorbţiei intestinale a lipidelor etc. Concentraţia plasmatică este de 150-350 mg/dL, originea lor fiind alimentară sau endogenă.

d. ***Acizii graşi*** intră în compoziţia trigliceridelor şi fosfolipidelor; sunt de fapt componenţii care înmagazinează energia în legăturile covalente dintre atomii de carbon constituenţi. Acidul arahidonic (un acid gras polinesaturat cu 20 atomi de carbon) este precursorul prostaglandinelor, leucotrienelor şi tromboxanilor. Acizii graşi sunt de fapt acizi carboxilici cu catenă lineară şi număr par de atomi de carbon, saturaţi sau nesaturaţi. Acizii graşi pot fi cu lanţ scurt (C2-6), lanţ mediu (C8-12) - caracteristici pentru bacterii, şi lanţ lung (C14-24) - aceştia se găsesc mai ales în structuri aparţinând organismelor superioare. Numerotarea atomilor de carbon din molecula acizilor graşi începe de la carbonul grupării carboxilice cu cifre arabe (1, 2, 3, ...), sau de la carbonul vecin acestuia dacă se utilizează alfabetul grecesc (α, β, γ, ...), ultimul atom de carbon fiind notat cu ω. După numărul atomilor de carbon se scrie numărul dublelor legături, cele două cifre fiind separate cu două puncte (de ex. C20:4). Acizii graşi nesaturaţi (polinesaturaţi) prezintă legături duble conjugate începând de la al treilea carbon dinspre capătul ω (de ex. C20:5 - eicosapentanoic acid).

Exemple de acizi graşi prezenţi în organism: saturaţi - acidul palmitic (C16:0), acidul stearic (C18:0); nesaturaţi - acidul oleic (C18:1), acidul linoleic (C18:2), acidul linolenic(C18:3), acidul arahidonic (C20:4), acidul eicosapentanoic (AEP - C20:5), acidul docosahexanoic (ADH – C22:6). Cele două clase de AG polinesaturaţi esenţiali sunt acizii omega-3 şi respectiv omega-6. Se formează în organism prin procese de elongare şi desaturare, pornind de la precursori esenţiali pentru organismul uman, sursa lor fiind exogenă: acidul α-linolenic (C18:3, ω-3) pentru clasa ω-3 şi respectiv acidul linoleic (C 18:2, ω-6) pentru clasa ω-6. Acidul linoleic şi acidul şi acidul α-linolenic sunt AG esenţiali, a căror sinteză este posibilă la nivelul celulelor vegetale. La nivelul organismului animal şi uman sinteza este imposibilă datorită lipsei enzimelor care inseră legătura dublă în poziţia omega-3 sau omega-6. Acidul linoleic, AG cu 18 atomi de carbon, precursorul clasei ω-6, are prima legătură dublă la nivelul atomului de carbon numărul şase pornind de la capătul metil terminal (capătul omega), fiind astfel denumit AG ω-6. Poate fi elongat şi desaturat în organismul uman şi al unor animale pentru a forma acidul arahidonic (C20:4, ω-6); acesta este sursa eicosanoizilor ω-6, care se formează prin oxidarea mediată de ciclooxigenază, lipooxigenază şi epoxigenază pentru a forma prostaglandine, leucotriene, lipoxine şi compuşi P-450 - importanţi mesageri chimici.

În citoplasma celulelor plantelor verzi (mai ales în alge şi fitoplancton), acidul linoleic poate fi desaturat în poziţia ω-3 pentru a forma acidul α-linolenic, AG cu 18 atomi de carbon, precursorul clasei ω-3. Aceleaşi enzime care transformă acidului linoleic, pot elonga şi desatura acidul α-linolenic pentru a forma analogul acidului arahidonic: acidul eicosapentanoic (C20:5, ω-3); acesta va intra în competiţie cu acidul arahidonic pentru aceleaşi ciclooxigenază, lipooxigenază şi epoxigenază, care generează clase diferite de eicosanoizi, care se pot opune sau contracarează efectele eicosanoizilor ω-6. Elongazele şi desaturazele au mai multă afinitate pentru AG mai nesaturaţi (clasa ω-3). Cu toate acestea AG supuşi cel mai frecvent proceselor de elongare şi desaturare sunt precursorii seriei ω-6, care se găsesc în majoritatea dietelor actuale în cantitate mare. În general eicosanoizii derivaţi din acidul arahidonic au caracter proinflamator şi agregant, în timp ce derivaţii acidului eicosapentanoic sunt antiiflamatori şi inhibă agregarea plachetară. Balanţa dintre cele două clase de eicosanoizi diferă în ţesuturile umane reflectând diversele obiceiuri alimentare. Astfel, datorită naturii competitivităţii şi a proprietăţiilor biologice, este importantă menţinerea echilibrului între AG ai claselor ω-6 şi ω-3 în dietă. Dacă se consumă mult acid linoleic şi puţin acid α-linolenic, calea prioritară de acţiune a enzimelor va fi ω-6, cu inhibarea etapelor corespondente ale celeilalte serii.

Studiile utilizând izotopi stabili au arătat că elongarea şi desaturarea acidului α-linolenic în organismul uman la AEP şi ADH se realizează la nivelul plasmei şi elementelor figurate sanguine. Aceste procese de conversie sunt însă lente şi limitate la om.

Acizii graşi liberi (AGL) plasmatici, sunt molecule amfipatice, material energetic pentru ţesuturile consumatoare, mai ales pentru fibra miocardică. Puţine celule nu au capacitatea de a utiliza AGL ca substrat energetic (hematia, neuronul). Doar o cantitate foarte mică din AG circulanţi (aproximativ 1%) se găsesc în LP plasmatice, majoritatea fiind fixaţi

prin forţe fizice pe albumină, care are pe suprafaţa ei 10 locusuri de fixare nespecifice. Concentraţia AGL în plasmă este foarte scăzută (15-30 mg/dL) - au un timp de înjumătăţire scurt (3-5 minute), fiind rapid preluaţi de celulele consumatoare.

8.1.2 Proprietăţile fizico-chimice şi biologice ale lipidelor

Catenele alifatice ale acizilor graşi sunt apolare, insolubile în apă, la fel ca şi trigliceridele şi esterii de colesterol. Lipidele compuse dar şi colesterolul liber (neesterificat), sunt însă substanţe amfipatice, având în moleculele lor atât porţiuni polare (fosfatice, aminice sau hidroxilice), cât şi apolare (catene alifatice, scheletul sterolic). Din acest motiv, pe o suprafaţă delimitantă între un mediu apos şi lipidic, aceste lipide se orientează într-un fel ordonat bifazic: porţiunea lor polară se aşează spre faza apoasă, cea apolară spre faza lipidică.

În mediu apos, lipidele compuse formează în mod spontan, prin autoasamblare liposomi - formaţiuni sferice, al căror înveliş conţine spre exterior porţiunea polară, iar spre interior porţiunea apolară a fosfolipidelor. În miezul bulelor este inclusă o parte a mediului apos, conţinând substanţele dizolvate. Pe această cale pot fi introduse în celulele organismului, medicamente hidrosolubile, incluse în interiorul liposomilor. Printr-un mecanism oarecum similar se formează şi lipoproteinele serice.

8.1.3 Rolul biologic al lipidelor

Rolul lor structural se manifestă prin participarea substanţială în alcătuirea diferitelor membrane biologice (membrana celulară, membranele organitelor subcelulare). Prin insolubilitatea lor în apă, lipidele din membrane asigură impermeabilitatea acestora pentru substanţele polare dizolvate.

Lipidele au un important rol funcţional în alcătuirea diferitelor structuri receptoare de membrană, de afinitate mare şi specificitate redusă (sfingolipide, inozitolfosfatide, diacilglicerol); în izolarea printr-un înveliş mielinic a axonilor neuronilor (sfingomieline, cerebrozide, gangliozide); în exercitarea unor funcţii biologice specifice (acizi graşi esenţiali, prostaglandine, prostacicline, tromboxani).

Funcţionează ca izolator termic, localizat subcutanat şi în jurul organelor externe.

Rolul energetic: „arderea" în organism a 1 g trigliceride furnizează 9,3 calorii, o cantitate mult superioară puterii calorice a glucidelor şi proteinelor. Datorită acestui fapt, precum şi datorită hidrofobiei grăsimilor neutre, se poate afirma că grăsimile neutre reprezintă mijlocul ideal al depozitului energetic celular. Ţesutul muscular striat periferic, precum şi miocardul, îşi acoperă nevoile energetice cu precădere (într-o proporţie de 80 %) prin oxidarea acizilor graşi. În ţesutul adipos brun al animalelor hibernante, acizii graşi se oxidează cu eliberarea energiei sub formă de căldură. O decuplare similară a oxidării de fosforilare poate să se manifeste în mitocondrii şi la organismele homeoterme, în caz de febră.

8.2 Lipoproteinele

Plasma recoltată *a jeun* este clară, deşi conţine 800-1200 mg lipide/100 ml. Datorită caracterului prin excelenţă hidrofob al lipidelor, în mediul apos plasmatic ele au nevoie de componente solubilizante / transportoare. Acizii graşi circulă pe suprafaţa albuminei, nu acelaşi lucru se întâmplă însă cu trigliceridele – prea mari şi prea hidrofobe pentru a fi transportate similar. Ele vor fi „împachetate" într-o manieră particulară, împreună cu colesterol, fosfolipide şi proteine, formând lipoproteine (LP). Lipoproteinele sunt agregate macromoleculare complexe, solubile în apă, formate spontan prin autoasamblarea necovalentă a diverselor categorii de lipide cu proteine specifice (Apolipoproteine - ApoP). Au rolul de a transporta în mediul apos plasmatic, moleculele insolubile ale lipidelor (inclusiv vitamine liposolubile), de la locul de absorbţie (intestinul subţire) sau sinteză (ficatul) la locurile de utilizare şi stocare (ţesuturile periferice). Rolul ApoP nu se rezumă însă la funcţia de vehicul, ele servind şi ca reglatori ai metabolismului lipidic: activează sau inhibă unele enzime (Lipoprotein lipaza - LPL, Lecitin-Colesterol-Aciltransferaza - LCAT) şi intervin în procesul de recunoaştere la nivel celular al LP prin receptori. Între diverse clase de LP plasmatice au loc de asemenea, schimburi de ApoP şi lipide, care facilitează metabolizarea LP.

8.2.1 Structura lipoproteinelor

S-au vehiculat mai multe teorii, actualmente fiind descrise două categorii structurale:

I. Lipoproteine - particule sferice, emulsionate sau microemulsionate, care conţin un miez lipidic apolar (TG, CE), învelit de o pătură de lipide polare (FL, Cl) şi apoproteine (*Figura 8.1 a, b*); în categoria emulsie sunt încadrate particule cu diametrul mai mare de 50 nm (Chilomicronii şi LP cu densitate foarte mică - Ch şi VLDL), iar în microemulsie - particulele mai mici de 50 nm (VLDL secundare, LP cu densitate intermediară - IDL-, cu densitate mică - LDL şi cu densitate mare - HDL_2).

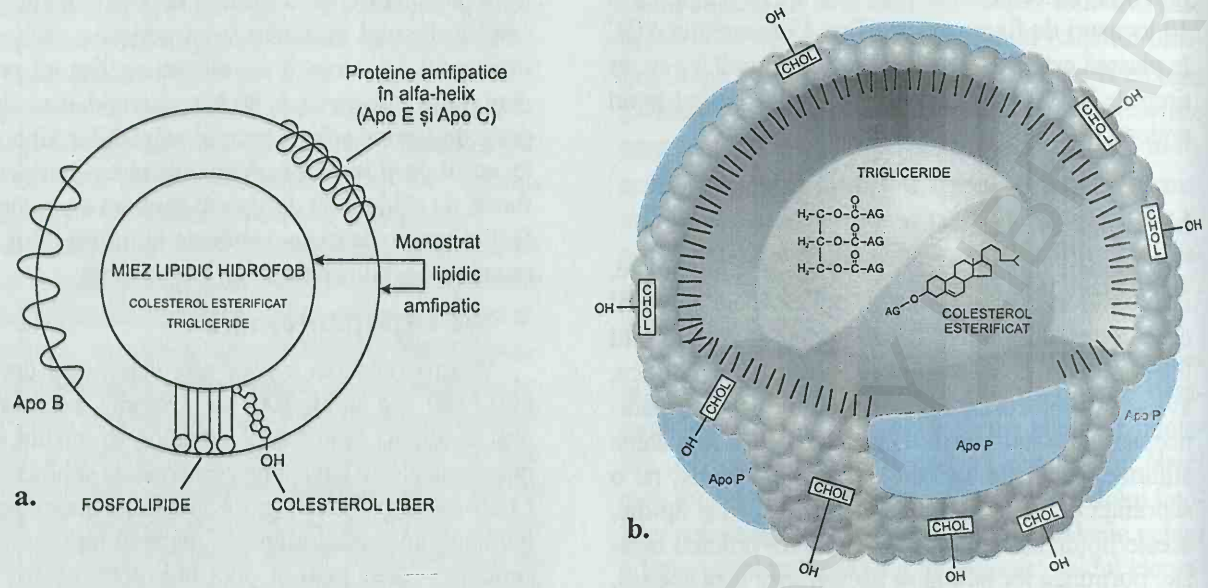


Figura 8.1. Model structural schematic (a) şi tridimensional (b) pentru lipoproteine

Clasele de LP diferă între ele prin proporţia între miezul hidrofob şi suprafaţa hidrofilă (vezi clasificarea LP): în LP mari (Ch şi VLDL), componentele hidrofile reprezintă doar o mică parte din masa totală a LP (2-10%), suprafaţa hidrofilă fiind imperfectă pe alocuri; în LP mici (HDL) dimpotrivă, învelişul hidrofil constituie majoritatea masei LP (60-75%).

II. Lipoproteine - particule discoidale, care nu conţin miez lipidic apolar, formate din lipide polare şi apoproteine, cu o conformaţie bistratificată (HDL nascent - *Figura 8.2*): cele două straturi FL sunt aşezate simetric, lanţurile acil ale acestora venind în contact, iar componenta polară fiind orientată spre mediul apos din jur; ApoP maschează bordura apolară a discului fosfolipidic; HDL au un rol special în controlul metabolismului ApoP, TG şi în transportul invers al colesterolului (de la ţesuturile periferice la ficat), alcătuind alături de HDL_3 şi HDL_2 aşa-numitul "sistem HDL".

Apoproteinele sunt peptide amfipatice cu masa moleculară redusă. Cu diferite lipide formează, prin autoasamblare rapidă, lipoproteinele. Principalele tipuri de apoproteine, caracteristicile şi rolul lor sunt prezentate în *Tabelul 8.I.*

1. Apo-AI: sunt peptide pure, neconţinând glucide, cu masa moleculară 28.000 D. Se formează în hepatocite şi sunt cuprinse în moleculele HDL într-o proporţie de 60-70% (din totalul Apo P), având un rol esenţial în transportul invers al colesterolului.
2. Apo-AII: sunt dipeptide cu masa moleculară de 36.000 D şi cu cei doi componenţi cuplaţi prin punţi disulfidice (-S-S-). Sunt prezente în particulele HDL într-o proporţie de 30-40%.
3. Apo-B: sunt glicoproteine cu masa moleculară mare. Apo B100 (514.000 D), formează partea proteică caracteristică a LDL; în cantităţi reduse se găsesc şi în VLDL precum şi în chilomicroni. Se fixează în mod specific pe receptorii LDL ai fibroblaştilor şi adipocitelor, prin care face posibilă pătrunderea colesterolului, dar şi a grăsimilor neutre, în aceste celule.

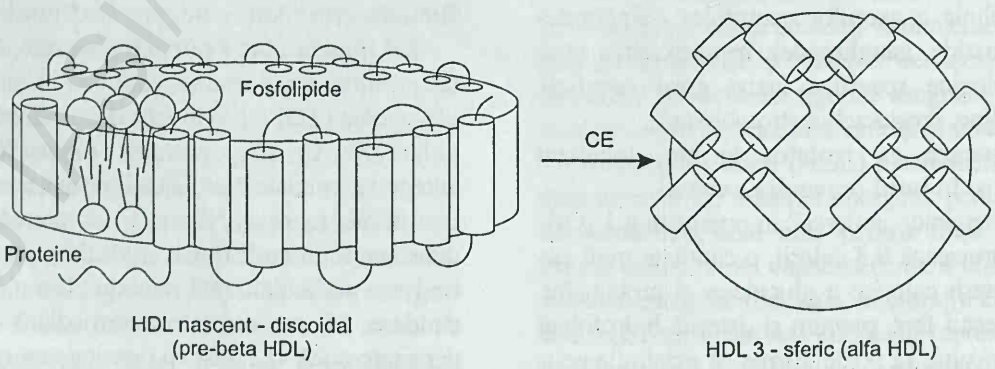


Figura 8.2. Structura lipoproteinelor cu densitate mare

Tabelul 8.I. Apoproteinele plasmatice

ApoP	GM (kD)	Sinteză	Funcţii
A-I	28	Intestin, Ficat	Proteină structurală a HDL, chilomicronilor, activator al LCAT
A-II	17.4	Intestin, Ficat	Proteină structurală a HDL, cofactor al LCAT, în concentraţie mare - inhibitor al Lipazei hepatice (LH)
A-IV	44.5	Intestin	Efluxul colesterolului şi transportul lui la ficat, activator LCAT
A-V	39	Ficat	Proteină structurală a VLDL, HDL, chilomicronilor, rol important în reglarea nivelului trigliceridelor plasmatice
B-100	514	Ficat	Proteină structurală a LDL, IDL, VLDL; ligand pentru receptorul LDL
B-48	241	Intestin	Esenţială pentru sinteza şi secreţia Ch şi VLDL
C-I	6.6	Ficat	Cofactor al LCAT în plasmă; transferată între HDL-VLDL
C-II	8.9	Ficat	Activator al LPL; în plasmă, este transferată între HDL – VLDL, chilomicroni
C-III	8.8	Ficat	Inactivator al LPL (inhibă clearance-ul Ch şi VLDL)
D	24	Ficat	Prezent în structura HDL, participă la transferul CE între LP
E	34	Ficat, Creier, Rinichi	Proteină structurală a VLDL, Ch, resturile Ch, IDL şi HDL; ligand pentru receptorii resturilor Ch şi IDL, în hepatocite
F	30	?	Proteină structurală a HDL, inhibă CETP
G	75	?	Proteină structurală a VHDL1
H	50	?	Proteină structurală a Ch şi VLDL, cofactor al LPL
J	70 – 90	Ficat, Creier, Ovar, Testicul	Transportul lipidelor, înnoirea membranelor, moartea celulară programată, reglarea sistemului complement
K	45	?	Transportul TG

4. Apo-B 48: este 48% din porţiunea N terminală a Apo B100, sintetizată în enterocite şi cu rol esenţial în absorbţia chilomicronilor.

5. Apo(a): este o apolipoproteină macromoleculară şi polimorfă (are multiple izoforme cu greutăţi moleculare în intervalul 200-800 kD) care se asociază cu Apo-B100 în structura LDL, formând Lp(a). Apo(a) prezintă omologii structurale marcate cu molecula plasminogenului. Din această cauză ea poate adera la resturi de lizină din proteinele membranelor celulare şi astfel poate introduce LDL în celule şi fără prezenţa receptorilor β-lipoproteinici pe suprafaţa acestora. Pe de altă parte, prin analogiile structurale cu plasminogenul (fără a avea însă şi activitate proteolitică), blochează situsurile de fixare ale acestuia pe fibrină şi înhibă fibrinoliza. Lp(a) este un factor de risc practic independent de ceilalţi parametri lipidici, îndeosebi pentru ateroscleroza coronariană şi cerebrală. Concentraţiile acesteia variază la populaţia generală între 0,2-120 mg/dL, pragul patologic fiind 30 mg/dL. La separarea electroforetică migrează în poziţie prebeta, are densitate mai mare însă decât LDL (la ultracentrifugare sedimentează).

6. Apo-C: peptide cu masa moleculară mică, având trei variante - Apo-CI, Apo-CII şi Apo-CIII. Se formează în celulele epiteliale intestinale şi participă la formarea chilomicronilor, VLDL, lipoproteinelor X, iar într-o măsură redusă şi a HDL. Reprezentanţii acestei clase de Apo sunt implicaţi în special în procese de activare/inhibare a enzimelor importante în metabolismul LP.

7. Apo-D: peptide prezente în cantităţi reduse în toate tipurile de lipoproteine. Au masa moleculară de 24.000 D.

8.2.2 Clasificarea lipoproteinelor după metoda de fracţionare

1. ***Ultracentrifugarea*** este o metodă utilizată mai ales în cercetare pentru separarea lipoproteinelor după ajustarea densităţii plasmei la 1,063 g/ml (pragul superior de densitate al clasei LDL); separarea LP se face la o forţă centrifugă de 40.000-100.000 g, folosind un echipament special. În urma ultracentrifugării se separă următoarele lipoproteine: chilomicroni, VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediar density lipoproteins), LDL (low density lipopro-

Tabelul 8.II. Caracteristicile fizice şi chimice ale principalelor clase de lipoproteine

LP / Caracteristici	Chilomicroni	VLDL	IDL	LDL	HDL
Concentraţie plasmatică "à jeun" (mg/dL)	0	0 - 50	0	500 - 650	200 - 300
Proprietăţi fizice					
Densitate (g/mL)	< 0,95	0,95 -1,006	1,007 -1,019	1,020 -1,063	1,064 -1,210
Diametru (nm)	75 - 1200	30 - 80	25 - 30	15 - 25	5 – 15
Sf (1,063)#	> 400	20 - 400	12 - 20	0 - 12	-
Migrare electroforetică	rămân la start	pre-β	între β - preβ	β	α1
(% fiziologic)	0-2 %	5-15%	0%	50-65%	20-30%
Compoziţie chimică (% relativ din total)					
Proteine	1 - 2	5 - 10	12 - 16	20 - 25	45 – 55
Trigliceride	90 - 96	50 - 65	25 - 40	6 - 12	3 – 6
Colesterol esterificat	1 - 3	8 - 14	20 - 35	35 - 45	8 – 20
Colesterol liber	1	5 - 8	7 - 11	6 - 10	1 – 6
Fosfolipide	2 - 6	12 - 18	15 - 22	20 - 25	25 – 40

Unitatea de flotaţie Svedberg =10^3 cm/sec/dyne/g, într-o soluţie de KBr cu densitate 1,063 g/ml (26°C).

teins), HDL (high density lipoproteins). Ultracentrifugarea fracţionează lipoproteinele pe baza densităţii lor, care este cu atât mai mică, cu cât cantitatea lipidelor conţinute este mai mare. Spre deosebire de proteine, într-un mediu cu o densitate superioară densităţii lor, lipoproteinele prezintă în cursul ultracentrifugării fenomenul flotaţiei. Unitatea de măsură a acesteia este valoarea Sf (S=Svedberg, f=flotaţie). *Tabelul 8.II* prezintă fracţiunile lipoproteinelor din plasmă în ordinea densităţii respectiv, valorii lor Sf.

2. ***Migrarea electroforetică*** în gel de agaroză: în lipoproteinograma (lipidograma) astfel obţinută pot fi identificate şi evaluate cantitativ lipoproteinele separate. Chilomicronii rămân pe linia de start, LDL migrează împreună cu β-globulinele, VLDL alcătuiesc lipoproteinele pre-β, iar HDL migrează cu α1-lipoproteinele - fracţiunea cea mai rapidă.

8.2.3 Caracteristicile fracţiunilor lipoproteice *(Tabelul 8.II):*

1. ***Chilomicronii (Ch)*** sunt formele emulsionate în plasmă ale grăsimilor neutre de origine alimentară. Lipsesc (sau sunt prezenţi în cantităţi foarte mici - sub 2% din totalul LP) din plasma recoltată pe nemâncate, apar însă în cea postprandială, a cărei opalescenţă şi uneori chiar lactescenţă este cauzată de grăsimile emulsionate prezente sub formă de picături de diferite dimensiuni. Picăturile groase cu diametrul între 0,5-1,5 μ sunt vizibile cu microscopul optic, folosind obiectivul mic. Conţin 1-2% proteine, cu precădere Apo-B48 şi Apo-C, dar şi cantităţi reduse de Apo-AII, Apo-AI şi Apo-E. În urma descompunerii prin lipoliză a conţinutului lipidic neutru al chilomicronilor, densitatea lor creşte, iar dimensiunile lor se reduc treptat. Chilomicronii se descompun în circulaţie sub acţiunea lipoprotein-lipazei, fixată pe suprafaţa celulelor endoteliale.

2. ***Lipoproteinele cu densitate foarte mică (Very Low Density Lipoproteins, VLDL, pre-β-LP).*** Se numesc şi chilomicroni endogeni, deoarece alături de cantităţi reduse (5-15%) de proteine (Apo-C, dar şi Apo-B, Apo-E şi cantităţi reduse de Apo-AI şi Apo-AII) conţin multe trigliceride şi colesterol liber produse în ficat. Sub acţiunea lipoprotein-lipazei se descompun treptat în circulaţia periferică. Au un rol însemnat în aterogeneză. Conţinutul normal în VLDL al plasmei este de 5-15% din cantitatea totală a lipoproteinelor.

3. ***Lipoproteinele cu densitate intermediară (Intermediar Density Lipoproteins, IDL).*** Se formează în plasma circulantă în urma descompunerii enzimatice a trigliceridelor din chilomicroni şi VLDL. Ele lipsesc din plasma recoltată pe nemâncate, cantitatea lor însă creşte în cursul perioadelor postprandiale. O variantă a IDL apare şi în serul bolnavilor cu dislipidemie ereditară de tip III (boala "benzii beta largi", *broad beta disease*). IDL au o perioadă de înjumătăţire plasmatică de câteva ore, se descompun enzimatic ca şi chilomicronii şi VLDL.

4. ***Lipoproteinele cu densitate mică (Low Density Lipoproteins, LDL, β-LP).*** Conţin din abundenţă colesterol esterificat (40%) alături de 17-25% proteine Apo-B100, produse de hepatocite. Se formează în plasma circulantă în urma des-

compunerii enzimatice (LPL) a TG din structura chilomicronilor şi VLDL precum şi a cedării Apo P (cu excepţia Apo B100) celorlalte clase de LP. Prin intermediul Apo-B100, capabilă să se fixeze de receptorii celulari specifici, LDL pătrund în celule printr-un mecanism activ de pinocitoză. Colesterolul esterificat prezent în LDL reprezintă un factor de risc aterogen, din care cauză este numit şi „colesterol rău". Din cantitatea totală a lipoproteinelor, plasma normală conţine 60-70% β-lipopropteine la bărbaţi şi 50-60% la femei. Există mai multe subclase de LDL, cele mai aterogene fiind cele mici şi dense (aşa-numitul „pattern B" de LDL).

5. ***Lipoproteinele cu densitate mare (High Density Lipoproteins, lipoproteinele α1, HDL)***, conţin 50% proteine - predominant Apo-AI şi Apo-AII, dar şi componente ale clasei Apo C. HDL nascent se formează în hepatocite, cu predominanţa fosfolipidelor în componenta lor lipidică (conţinut în colesterol şi TG este minim). În momentul lansării lor în circulaţie, au formă elipsoidală. În urma captării de colesterol şi a esterificării acestuia, macromoleculele devin sferice (din cauza retragerii colesterolului esterificat apolar în miezul particulelor). Astfel colesterolul din periferie este transportat înapoi în ficat de către clasa HDL. Colesterolul esterificat vehiculat de HDL nu reprezintă risc aterogen, fiind considerat „colesterolul bun". Din totalul lipoproteinelor, în condiţii fiziologice, plasma conţine 20-25% HDL la bărbaţi şi 25-30% la femei.

6. ***Lipoproteina-X.*** Reprezintă o formă patologică de lipoproteină, care se formează în hepatocite în cursul unor stări de colestază. Din punct de vedere structural este LDL, dar conţine mai multe fosfolipide şi colesterol liber şi are Apo-C, molecule de albumină, Apo-AI şi Apo-E. În cursul fracţionării electroforetice în gel de agaroză, spre deosebire de celelalte lipoproteine, migrează spre catod. Lp-X apare în ser şi în caz de lipsă congenitală a lecitin-colesterol-acil-transferază (LCAT).

8.3 Metabolismul lipidelor / lipoproteinelor

8.3.1 Enzime implicate în metabolizarea lipoproteinelor în plasma circulantă

În cursul transportului lor sanguin, lipoproteinele suferă multiple transformări sub acţiunea diferitelor enzime:

1. Lipoprotein-lipaza (LPL, factorul de clarificare a plasmei): se formează în celulele endoteliale şi este ancorată de heparan-sulfaţi în membranele lor, spre lumenul vascular. Enzima are masa moleculară cuprinsă între 34.000-73.000 D, este activată de Apo-CII în prezenţa heparinei (care are funcţia de cofactor). Ionii Cl^- au un efect inhibitor asupra enzimei. Fixând temporar pe suprafaţa endoteliului chilomicronii exogeni şi endogeni (VLDL), enzima descompune trigliceridele din miezul acestora. Acizii graşi eliberaţi în urma lipolizei pătrund în celulele învecinate, unde se metabolizează, iar excesul se fixează labil de albumine şi sunt transportaţi în plasmă spre alte ţesuturi consumatoare. În cursul lipolizei are loc şi micşorarea treptată a dimensiunilor chilomicronilor şi ale VLDL (odată cu creşterea densităţii acestora). Resturile chilomicronilor şi VLDL (numite de fapt IDL), pot fi captate de ficat prin intermediul receptorilor înrudiţi cu receptorul clasic de LDL (LRP - LDL Receptor Related Protein) sau se transformă mai departe în LDL (sub acţiunea LPL).

2. Triglicerid lipaza hepatică (TGLH) este localizată pe suprafaţa celulelor endoteliale ale capilarelor intrahepatice. Descompune TG din resturile VLDL (parţial digerate de LPL) şi din HDL_2 (care transportă în ficat excesul de TG şi CE din periferie). Se activează tot în prezenţa cofactorului heparină, dar nu are nevoie şi de prezenţa Apo-CII (ca LPL).

3. Lecitin–colesterol–acil-transferaza (LCAT) se formează în hepatocite şi este excretată în plasmă împreună cu HDL nascent. Enzima este activată de Apo AI şi descompune parţial fosfolipidele (cu precădere moleculele de lecitină) din membranele celulelor periferice sau din HDL, transferând o moleculă de acid gras pe o moleculă de colesterol liber din HDL_3 (esterificarea grupării hidroxilice de la atomul de carbon C3). Colesterolul esterificat îşi pierde caracterul amfipatic şi devine un component apolar, care alunecă în miezul HDL_3. Sub această formă ambalată şi izolată prin învelişul proteic al HDL, moleculele de colesterol esterificat sunt transportate înapoi la hepatocite.

8.3.2 Receptorii de lipoproteine

8.3.2.1 Receptorul pentru LDL - ApoB/E

Receptorii specifici pentru LDL (**R LDL, receptor ApoB/E**) şi resturile Ch sau de VLDL (**LRP**), au ca liganzi Apo B100 sau Apo E (preferabil). Aceşti receptori sunt proteine mari (839 Aa) cu cinci domenii structurale:

1. Capătul amino- (la care se va lega LDL sau resturile VLDL) este alcătuit din şapte sec-

venţe repetitive de aproximativ 40 Aa, şase dintre acestea având resturi de cisteină;

2. Cel de al doilea domeniu are structură similară cu precursorul factorului de creştere epidermic (EGFP) şi este important în eliberarea LDL de pe receptor (în interiorul endozomilor pH-ul acid favorizează procesul);

3. Al treilea domeniu conţine numeroase resturi de serină şi treonină la care se ataşează resturi glucidice prin O-glicozilare (are importanţă în exprimarea receptorului pe suprafaţa membranei celulare);

4. Domeniul patru asigură fixarea R LDL în membrana celulară (este bogat în Aa hidrofobi)

5. Capătul carboxil conţine o secvenţă cu rol de semnal, necesară pentru internalizarea complexului R LDL - LDL.

După internalizarea receptorului cu ligandul său, aceştia se cuplează cu lizozomii intracelulari, în care receptorul este eliberat rapid şi se reîntoarce pe suprafaţa membranei (ciclul se poate relua de zeci de ori), iar LDL este descompus: Aa şi lipidele rezultate intră în fondul metabolic al celulei, fiind utilizate pentru sinteze, eliberare de energie, iar excesul poate fi depozitat, dar exercită şi funcţii reglatoare importante (*vezi 8.3.3.2*).

Timpul de înjumătăţire al receptorilor de LDL este de aproximativ 1,5 zile (prin comparaţie, la şoarece este de 1,5 ore). Datorită unei afinităţi mai mici a LDL decât a IDL pentru receptorii Apo B/E (ApoE are o afinitate mai bună decât Apo-B100), LDL sunt recirculate 48-72 ore înainte de a pătrunde în celule, ceea ce le creşte aterogenicitatea datorită modificărilor survenite în circulaţie.

8.3.2.2 Receptorii scavenger („gunoier")

Receptorii scavenger participă la îndepărtarea unor resturi moleculare/ celulare, polianionice, endo- sau exogene, de către celulele cu capacitate fagocitară. Unii dintre aceştia sunt implicaţi în captarea agresivă în placa de aterom a LP modificate prin oxidare sau acetilare şi în transformarea fagocitelor în celule spumoase. În funcţie de caracteristicile structurale, receptorii scavenger se clasifică în trei clase:

1. Clasa A (SR - A) sunt glicoproteine trimerice (3 x 80 kD) cu fragmentele C terminale în exteriorul celulei, exprimate mai ales pe suprafaţa macrofagelor, fiind implicate în internalizarea LDL acetilate sau LDLox. Aceşti receptori au similitudini dar şi diferenţe semnificative faţă de receptorul LDL specific: monomerul este mai scurt (~ 450 Aa), domeniul C terminal este acela la care se fixează ligandul; lanţul este compus din şase domenii structurale: 1) fragmentul N-terminal (50 Aa) se găseşte în citosolul celulei; 2) porţiunea hidrofobă ancorată intramembranar (25 Aa); 3) domeniu cu structură bogată în prolină, flexibil, nu foarte bine organizat (75 Aa); 4) structură în alfa-helix (120 Aa); 5) domeniu cu structură asemănătoare colagenului (70 Aa); 6) domeniul extern bogat în cisteină (esenţial pentru legarea LP). Această clasă de receptori de LP conţine un tip particular de receptor: lectinic (SR – CL); acesta este un receptor endotelial, care are la capătul carboxil un domeniu de recunoaştere carbohidrazic (C-type carbohydrate - recognition domain CRD), înalt specific pentru trizaharidele Lewis (x) de pe suprafaţa leucocitelor şi a unor celule tumorale.

2. Clasa B (SR - B) şi receptorul CD36 captează LDLox; au două domenii trans-membranare şi capătul carboxil extern bogat în cisteină şi înalt glicozilat; se exprimă în caveole membranare – aglomerări în ciorchine a mai multor receptori. Există o subclasă SR-B1 (82 kD) –exprimată mai ales pe hepatocite, care poate interacţiona şi cu LP native: interacţiunea cu HDL (în care un rol extrem de important îl are Apo AI) joacă un rol primordial în metabolismul HDL şi transportul invers al colesterolului; expresia acestui receptor este stimulată de Receptorul Hepatic X (LXR), dar şi de PPARγ (peroxisome proliferator –activated receptor) şi NK4α (factorul nuclear 4 alfa hepatic). Receptorul CD36 este implicat în adeziunea celulară, în fagocitoza celulelor apoptice şi în metabolismul acizilor graşi cu lanţ lung.

3. Clasa C de receptori scavenger sunt proteine transmembranare cu regiunea N-terminală localizată extracelular, conţinând structuri de tip mucinic.

4. Alţi receptori scavenger: LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1) a fost izolat din celule endoteliale aortice (SR-EC), macrofage şi celule musculare netede vasculare; este indus de stimuli inflamatori şi se consideră că are implicaţii în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice.

8.3.3 Metabolismul şi circuitul plasmatic al lipoproteinelor

Căile metabolice ale diferitelor tipuri de lipoproteine au în comun următoarele **etape**:

- *Sinteza*: în urma autoasamblării spontane a lipidelor cu apoproteine în celulele mucoasei intestinale sau în hepatocite se formează lipoproteine "nascente" (primare): Ch, VLDL, HDL - deversate apoi în circulaţie.

- *Transportul plasmatic / Catabolismul*:
  - schimbul neenzimatic de proteine şi lipide între lipoproteinele plasmatice - se formează lipoproteine "mature" (secundare).
  - hidroliza trigliceridelor din Ch şi VLDL duce la apariţia resturilor de Ch şi VLDL, respectiv a formelor IDL şi LDL.
- *Captarea*: chilomicronii secundari, VLDL secundari şi IDL sunt captate de către receptorii celulari hepatici (LRP), iar LDL de către receptorii specifici periferici (LDL R).
- HDL *transportă în sens invers colesterolul*, de la periferie la ficat (hepatocitele au HDL receptori: receptori *scavenger* SR B1).

Metabolismul lipoproteinelor poate fi evaluat cel mai bine urmărind diferitele clase de lipoproteine de la locul sintezei la locul de catabolizare:

8.3.3.1 Calea exogenă (metabolismul lipidelor exogene)

Chilomicronii (Ch) sunt transportorii lipidelor exogene (alimentare), absorbite sub formă de monogliceride, acizi graşi liberi şi colesterol. În reticulul endoplasmatic neted al celulelor intestinale acizii graşi liberi sunt reesterificaţi în trigliceride, sunt înzestraţi cu apoproteinele ApoB48 respectiv ApoA I (sintetizate de către reticulul endoplasmatic rugos) şi trec iniţial în limfă şi ulterior ajung în circulaţia sanguină. În circulaţie au loc nişte schimburi neenzimatice de lipide şi Apo P între diferitele tipuri de lipoproteine: CETP transferă CE de pe HDL2 pe VLDL şi IDL, iar TG invers; Apo CII şi Apo E trec de pe HDL pe chilomicroni, iar ApoA I invers. Chilomicronii sunt metabolizaţi în principal în ţesutul adipos şi muscular, dar şi în miocard şi glanda mamară lactigenă. Apo CII activează lipoproteinlipaza (LPL) endotelială prin acţiunea căreia *chilomicronii secundari* pierd trigliceride, acestea fiind transformate în acizi graşi liberi şi glicerol – "prima cascadă lipolitică". Acizii graşi liberi pot fi utilizaţi în scop energetic de către muşchi, sau pot fi folosiţi pentru resinteza trigliceridelor în ţesutul adipos. Glicerolul ajunge la ficat şi participă la gluconeogeneză. Resturile chilomicronilor (conţinând CE) sunt eliminate din circulaţie de către receptori specifici (LRP) prezenţi în ficat (ApoE este ligandul resturilor de chilomicroni). La trei ore postprandial în mod normal nu mai există chilomicroni în circulaţie ($t_{1/2}$ este de aproximativ 1-2 ore). Colesterolul rămâne în resturile chilomicronilor.

8.3.3.2 Calea endogenă (metabolismul lipidelor endogene)

Calea endogenă începe în ficat, care produce şi eliberează în torentul sanguin VLDL. Acestea conţin în miezul hidrofob mai ales TG endogene (sintetizate în ficat), o cantitate mică de CE şi FL, iar la suprafaţă - Apo B100 şi Apo E. Sub acţiunea LPL scade conţinutul în TG al VLDL - "a II-a cascadă lipolitică" -, resturile VLDL (mai bogate în CE) fiind transformate în IDL. Cel puţin jumătate din IDL formate în această "cascadă lipolitică" sunt rapid preluate în ficat (prin receptori specifici pentru Apo E - LRP); lipidele sunt convertite din nou în VLDL, iar CE în acizi biliari. Restul IDL circulante pierd în continuare TG (sub acţiunea LPL), apoi transferă Apo E pe HDL şi sunt transformate în LDL.

În metabolismul lipoproteinelor cu Apo B s-au descris **11 etape** (*Figura 8.3*):

1. Lipidele alimentare (TG, colesterol, fosfolipide) sunt emulsionate în duoden în prezenţa sărurilor biliare formând micelii mixte; AGL şi Aa stimulează eliberarea pancreozimin-colecistochininei şi a secretinei, care stimulează secreţia şi eliberarea lipazei pancreatice şi a bilei hepatice şi veziculare. În prezenţa unei co-lipaze şi a ionilor Ca^{2+}, lipaza pancreatică hidrolizează TG la 2-monogliceride (2-MG) şi AGL, acestea putând fi transportate în epiteliul intestinal.
2. În citosolul enterocitelor cea mai mare parte a MG sunt reacilate în DG şi TG şi o parte din colesterol este esterificat. În reticulul endoplasmic sunt sintetizate Apo P (Apo B48, AI, AIV şi la unele specii Apo B100) şi anexate grupări hidrocarbonate. În aparatul Golgi lipidele se autoasamblează cu glicoproteinele, formându-se Ch nascenţi (primari), care se eliberează prin membrana enterocitară latero-bazală în vasele limfatice şi ulterior, prin ductul toracic, în circulaţia sanguină.
3. În circulaţia sanguină Ch sunt supuşi unei succesiuni de evenimente cunoscute sub denumirea de "cascada lipolitică". Iniţial au loc o serie de modificări fizice ale Ch primari: adsorbţia Apo CII şi E pe suprafaţă, cu transferul la schimb a Apo AI pe HDL. Concentraţia CL este foarte scăzută în Ch primari, comparativ cu endoteliul vascular, elementele figurate sanguine şi alte LP, ceea ce stimulează transferul acestuia de pe HDL pe Ch (la schimb cu TG). Unele FL trec de pe Ch pe HDL.
4. Prin legarea în situsurile "heparin-like" chilomicronii ajung în vecinătatea LPL ancorate

în endoteliul capilar; Apo CII prezente pe suprafaţa Ch, activează specific LPL, care hidrolizează TG accesibile, ceea ce conduce la scăderea volumului şi la creşterea densităţii Ch, care vor deveni Ch secundari; AGL se leagă de albumina plasmatică transportoare şi sunt distribuite ţesuturilor consumatoare; FL rămân în exces la suprafaţa Ch şi o parte vor fi transferate pe HDL astfel încât raportul FL / CL devine aproximativ 2/1. Această situaţie şi prezenţa Apo AI în Ch secundari este favorabilă acţiunii LCAT: tranformă CL de la suprafaţa Ch în CE, care alunecă în miezul LP, împingând TG spre suprafaţa particulei unde sunt accesibile din nou LPL. Astfel conţinutul în TG al Ch scade dramatic, în urma acţiunii corelate a celor două enzime formându-se resturile Ch.

5. Resturile Ch conţin Apo E, astfel încât la întoarcerea sângelui în patul capilar hepatic aceste particule sunt recunoscute de receptorii resturilor Ch (LRP) şi rapid îndepărtate din circulaţie. În citoplasma hepatocitului particulele sunt descompuse în AG, CL, Aa etc, care intră în fondul metabolic celular; AG sunt utilizaţi ca substrat energetic sau pentru sinteza "de novo" a FL, TG, CL, iar Aa - în sinteze proteice. Substanţele sintetizate sunt resecretate sub formă de VLDL, sau depozitate (TG).

6. Colesterolul intrat în hepatocit controlează sinteza endogenă a colesterolului, sinteza şi exprimarea receptorilor, depozitarea intra-celulară a CE, sinteza acizilor biliari. Îndepărtarea colesterolului din ficat se realizează prin încorporarea lui în VLDL (şi secreţia în sângele circulant), fie prin transformarea lui în acizi (săruri) biliari şi excreţia prin bilă.

7. În hepatocit VLDL sunt asamblate în reticulul endoplasmic şi cisternele aparatului Golgi, într-o manieră similară sintezei intestinale a Ch. Între Apo P din structura VLDL se găsesc în mod obligatoriu Apo B100, E, AI şi probabil unele Apo C.

8. VLDL nascente (primare) sunt eliminate prin exocitoză în spaţiul Disse (deci direct în compartimentul plasmatic); VLDL au un raport al lipidelor de suprafaţă foarte asemănător Ch, cu o cantitate foarte mică de CL; Apo AI este rapid transferată pe HDL în schimbul altor Apo P (mai ales Apo CII), iar CE este adsorbit din diverse surse, ca şi în cazul Ch.

9. În capilarele ţesuturilor periferice TG din VLDL sunt hidrolizate de LPL într-o manieră similară Ch, transformându-se în resturi VLDL (VLDL secundare). Resturile VLDL mari sunt preluate de ficat, iar cele mici se transformă în IDL şi ulterior în LDL.

10. IDL pot fi şi ele preluate de ficat, prin aceeaşi receptori ca şi resturile Ch sau VLDL (LRP); TG şi FL în exces sunt hidrolizate sub acţiunea TGLH, LP devenind mai mici, iar prin cedarea

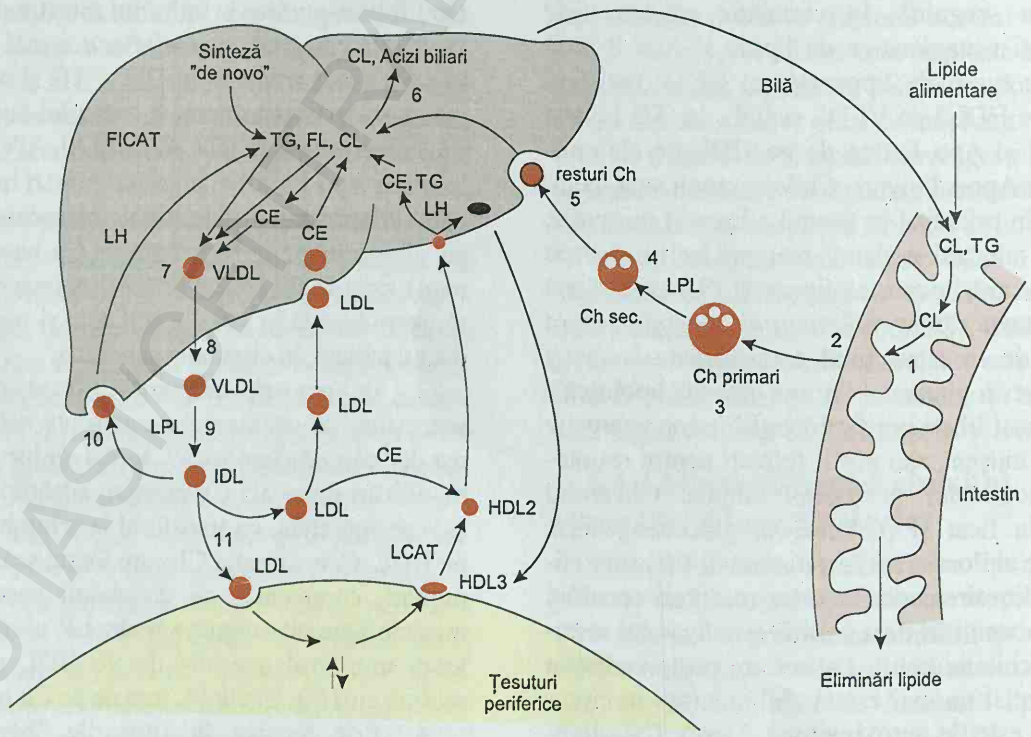


Figura 8.3. Reprezentare schematică a metabolismului lipoproteinelor

Apo E şi C se transformă în LDL. În condiţii fiziologice, transformarea resturilor VLDL în LDL are loc rapid şi se pare că preluarea hepatică a IDL nu este obligatorie pentru trecerea în LDL, procesul având loc şi în torentul circulator ca rezultat al "cascadei lipolitice". Rolul TGLH în această remodelare este însă dovedit.

11. LDL circulante sunt preluate de celulele periferice prin receptori, de către macrofage (celulele "gunoier"), dacă LDL au fost modificate şi de către hepatocite dacă LP sunt în exces (mai mult de ¾ din LDL sunt metabolizate hepatic); aproximativ 40% din LDL existente normal în plasmă se catabolizează în 24 ore, timpul mediu de recirculare a LDL fiind de trei zile. Receptorii specifici pentru LDL funcţionează la capacitatea maximă la concentraţia LDL de 20 mg/dL; deoarece concentraţia fiziologică a LDL este de 5-6 ori mai mare, în mod natural tabloul plasmatic al LP este favorabil procesului aterogen.

În timpul proceselor cronologic relatate mai sus, au loc schimburi de colesterol şi fosfolipide între LP: CL tinde să circule în sensul realizării unui echilibru (particulele născânde - sărace în CL - captează CL din membranele celulare şi LP în transformare); CL este esterificat de LCAT în structura HDL_3; CE trece de la LP în care este abundent reprezentat la LP sărace în CE (de exemplu de la LDL la HDL_3, sau de la HDL_3, la resturile VLDL şi Ch) prin intermediul CETP (*vezi Figura 8.4*); sistemul este astfel într-un echilibru dinamic, cu schimb permanent de lipide şi Apo P între LP (mai puţin de Apo B100, care pare cel mai stabil marker al LP din cascada lipolitică).

8.3.3.3 Transportul invers al colesterolului. Sistemul - HDL

Organismul uman nu poate descompune nucleul steranic; pentru eliminarea colesterolului din organism, acesta va fi iniţial transportat la ficat şi apoi eliminat prin bilă. Metabolismul HDL a fost iniţial mai puţin cunoscut şi plasat undeva la conexiunea celor două căi mai sus expuse (exo- şi endogenă). Unele surse consideră metabolismul HDL "a III-a cascadă lipolitică". Lecitină Colesterol Acil Transferaza (LCAT), în colaborare cu proteinele de transfer plasmatic al lipidelor (CETP) şi HDL, alcătuiesc sistemul de transport invers al colesterolului de la ţesuturile periferice la ficat. Clasa de LP cu densitate mare este poate cea mai heterogenă dintre clasele de LP, atât ca formă cât şi ca structură. Lipoproteinele cu densitate mare provin din cel puţin trei surse: ficat, intestinul subţire şi probabil ca rezultat al cascadei lipolitice, prin dezintegrarea resturilor Ch şi VLDL. Lipoproteinele cu densitate mare produse de intestin sunt bogate în Apo AIV, dar nu conţin Apo E. Lipoproteinele cu densitate mare hepatice conţin Apo AI şi/sau E şi sunt substratul preferenţial pentru LCAT, fiind elemente de bază în siste-

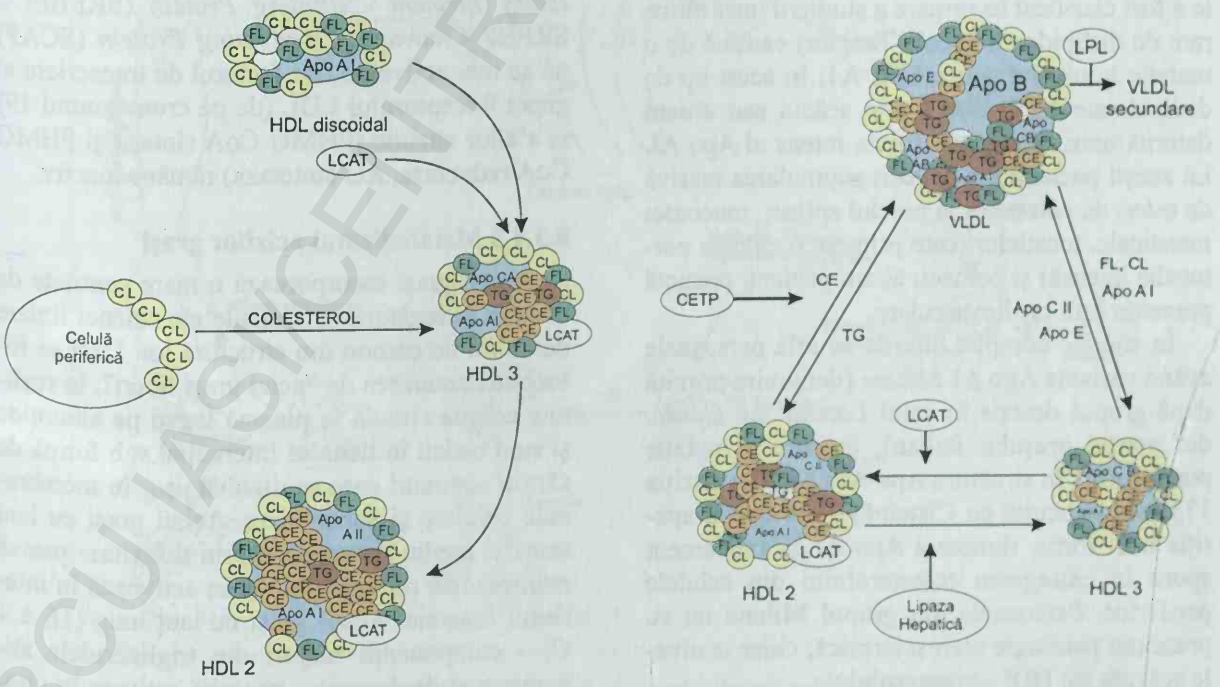


Figura 8.4. Sistemul HDL - Transportul invers al colesterolului

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mul de transport invers al excesului de colesterol dinspre periferie spre ficat (*Figura 8.4*).

Colesterolul liber poate proveni de la alte lipoproteine plasmatice (prin transfer de lipide între diferitele clase de lipoproteine), dar şi din membrana celulelor periferice (colesterol "îmbătrânit").

HDL primare (preβ HDL) provenind din ficat au formă discoidală şi sunt bogate în fosfolipide şi Apo AI. Acestea sunt principalii acceptori de CL din membranele celulare la care se ataşează (prin Apo A1) de receptori specifici **ABC A1** (ATP-binding cassette transporter A1) sau **CERP** (Cholesterol Efflux Regulatory Protein). Sub acţiunea LCAT, CL este apoi esterificat şi particula discoidală se transformă într-o particulă sferică (HDL_3), cu un conţinut sporit în CE şi implicit, cu o densitate mai mică. Această LP participă la schimbul de lipide mediat de CETP, cedând CE în schimbul TG, la VLDL secundare şi IDL. Astfel HDL_3 se transformă în HDL_2; colesterolul din acestea este captat în ficat prin intermediul receptorilor scavenger SR B1 (fără să internalizeze însă HDL) sau a receptorilor HDL, iar prin acţiunea HTGL este refăcut HDL nascent. Ficatul elimină excesul de colesterol prin bilă, în formă liberă sau transformându-l în acizi şi săruri biliare. În transportul colesterolului din hepatocit spre canaliculele biliare au un rol important doi transportori hepatici: ABC G5 şi ABC G8 (ATP-binding cassette transporter G5 şi G8).

Rolul CERP în efluxul colesterolului din celule a fost clarificat ca urmare a studierii unei forme rare de dislipidemie (boala Tangier) cauzată de o mutaţie la nivelul genei ABC A1; în acest tip de dislipidemie HDL este foarte scăzut sau absent datorită unui catabolism foarte intens al Apo AI. La aceşti pacienţi s-a dovedit acumularea masivă de esteri de colesterol la nivelul splinei, mucoasei intestinale, tonsilelor (care primesc o culoare portocalie intensă) şi corneei; aceşti pacienţi prezintă prematur boli cardiovasculare.

În situaţie complet diferită se află persoanele având varianta Apo AI *Milano* (denumire primită după grupul descris în satul *Limone sul Garda,* din nordul oraşului italian), în care o mutaţie punctiformă în structura Apo AI (Arg din poziţia 173 este înlocuită cu Cisteină) a condus la apariţia unei forme dimere a Apo AI cu randament sporit în extragerea colesterolului din celulele periferice. Persoanele din grupul Milano nu au prezentat patologie aterosclerotică, chiar la nivele scăzute ale HDL-colesterolului.

8.3.4 Metabolismul lipidelor

8.3.4.1 Metabolismul intracelular al colesterolului

Numeroase ţesuturi pot sintetiza colesterol "de novo" (din acetil-coenzima A) cu un mare efort energetic, dar preferă să îl primească din exterior captând LDL prin intermediul receptorilor LDL. LDL este principalul transportor al esterilor de colesterol în plasmă, având ApoB100 ca apoproteină unică. LDL este captat de celule (80% de hepatocite, iar restul de fibroblaşti, celule musculare netede, adipocite şi mai ales de celulele glandulare producătoare de hormoni steroizi: gonade, corticosuprarenale) prin intermediul receptorilor LDL (*Figura 8.5*), conform teoriei lui Goldstein şi Brown (premiul Nobel în 1985). Complexul format între LDL şi LDL R este internalizat sub forma unei vezicule, care fuzionează cu endozomii intracelulari; pH-ul acid intravezicular favorizează disocierea LDL de receptorul său; receptorul se reîntoarce pe suprafaţa celulei, iar LDL este descompus în componentele sale, care intră în fondul metabolic comun al celulei.

În celule colesterolul participă la rigidizarea structurilor membranare, este materia primă pentru sinteza hormonilor steroizi, acizilor biliari, vitaminei D. Colesterolul în exces este esterificat sub acţiunea ACAT (AcilCoA: Acil Colesterol Transferaza). Prin blocarea de către oxisterol a heterodimerului *Receptor Hepatic X – Receptor Retinoid X* (LXR-RXR), complexul *Sterol Regulatory Element - Binding Protein* (SREBP) – SREBP *Cleavage – Activating Protein* (SCAP) nu se mai activează, iar factorul de transcriere al genei Receptorului LDL (de pe cromozomul 19) şi a altor enzime (βHMG CoA sintaza şi βHMG CoA reductaza, AG sintetaza) rămâne inactiv.

8.3.4.2 Metabolismul acizilor graşi

Acizii graşi incorporează o mare cantitate de energie în legăturile covalente ale catenei liniare de atomi de carbon din structura lor. Deşi se foloseşte denumirea de "acizi graşi liberi", în realitate aceştia circulă în plasmă legaţi pe albumine şi sunt cedaţi în lichidul interstiţial sub formă de săruri/ săpunuri care se dizolvă uşor în membranele celulare şi subcelulare. Acizii graşi cu lanţ scurt şi mediu traversează prin difuziune pasivă membranele mitocondriei şi se activează în interiorul acesteia. Acizii graşi cu lanţ lung (16 ± 4 C) - componenţii majori din trigliceridele alimentare şi de depozit – necesită activare în cito-

plasmă (sunt transferaţi pe CoA de acid gras tiokinază) şi apoi transportaţi în spaţiul intermembranar mitocondrial unde sunt preluaţi de *naveta carnitină* (molecula de carnitină este mai mică decât cea de CoA, pentru care membrana internă mitocondrială este impermeabilă).

Descompunerea oxidativă a acizilor graşi prin β-oxidare (*Figura 8.6a*) este de fapt o succesiune de reacţii de dehidrogenare prin intermediul FAD şi NAD^+) în 4 etape (similare cu secvenţele de reacţii de la succinat la oxalacetat în ciclul Krebs), în urma cărora catenele acizilor graşi se fragmentează în compuşi C2 (acetil-CoA). AG nesaturaţi sunt parţial oxidaţi (pentru descompunerea lor se foloseşte mai puţin FAD şi rezultă mai puţin ATP); descompunerea lor are loc prin succesiunea celor 4 faze ale ß-oxidării până la atomul de carbon cu legătură dublă la care prima etapă de dehidrogenare (cu FAD) nu mai este necesară, iar celelalte trei reacţii decurg similar. AG având un număr impar de atomi de carbon, se descompun până la compusul C3 (propionil-CoA), care prin fixare de bioxid de carbon (C1), se transformă în succinat (C4), care se oxidează sau se transformă în ciclul acizilor tricarboxilici. Biosinteza AG nu se desfăşoară prin simpla inversare a ß-oxidării din mitocondrii, ci are loc în citoplasmă, în cadrul unui complex multienzimatic reductiv comun (alcătuit din şapte enzime), în care predomină NADPH şi în cadrul căruia AG formaţi sunt fixaţi de o proteină vehiculantă (Acyl Carrier Protein, ACP). Secvenţa reacţiilor de biosinteză porneşte de la acetil-coenzima-A, care fixează o moleculă de bioxid de carbon (C1) şi se transformă în malonil-CoA. Aceasta din urmă se condensează cu o nouă moleculă de acetil-CoA şi prin eliminarea bioxidului de carbon fixat anterior, se transformă în acetoacetil-CoA (C4). Prin fixări succesive de malonil-CoA şi eliminări concomitente de CO_2, catena de acid gras se alungeşte cu fragmente C2. În cursul formării acidului palmitic (C16), se repetă 7 cicluri reductive de condensare şi se consumă 14 mol NADPH, proveniţi din transformarea acidului malic în acid fosfo-enol-piruvic (by pass-ul gluconeogenezei) şi din ciclul pentozo-fosfaţilor. Schema biosintezei citoplasmatice a acizilor graşi este reprezentată în *Figura 8.6 b.*

8.3.4.3 Cetogeneza

În cazul creşterii cantităţii compuşilor C2 (acetil-CoA) în fondul metabolic comun, atât din cauza producţiei lor excesive, cât şi a scăderii însemnate a consumului lor (pentru biosinteze şi

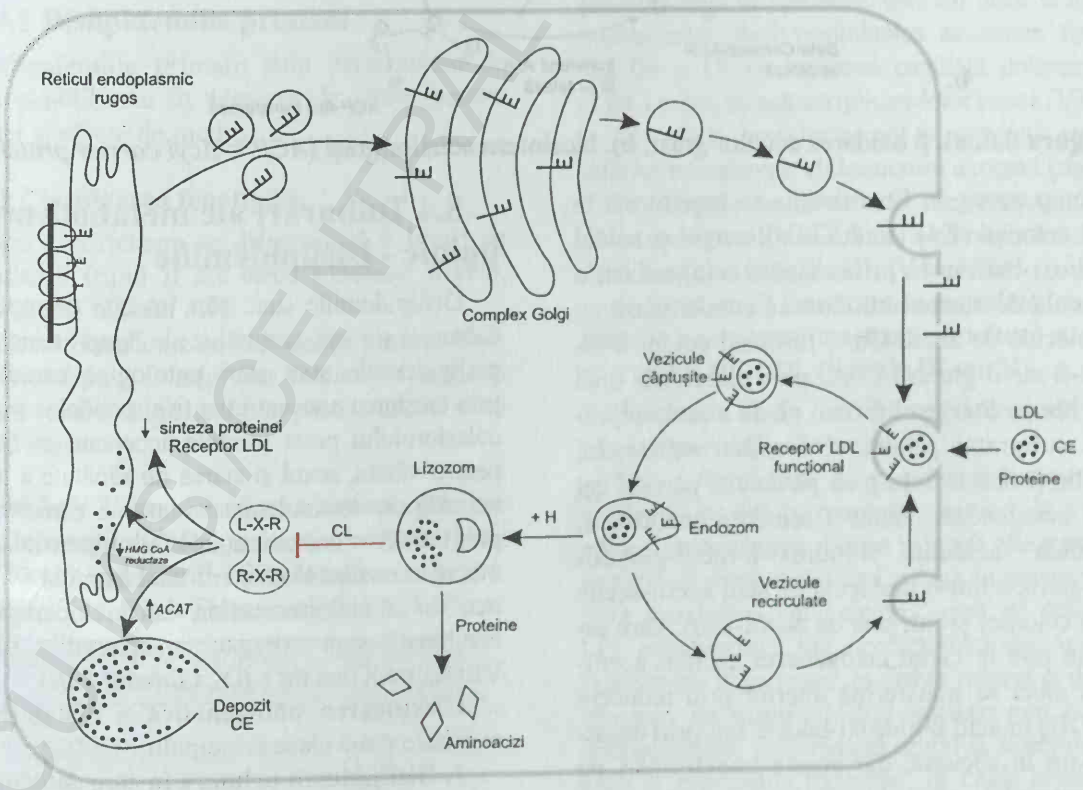


Figura 8.5. Etapele preluării şi metabolizării celulare a LDL

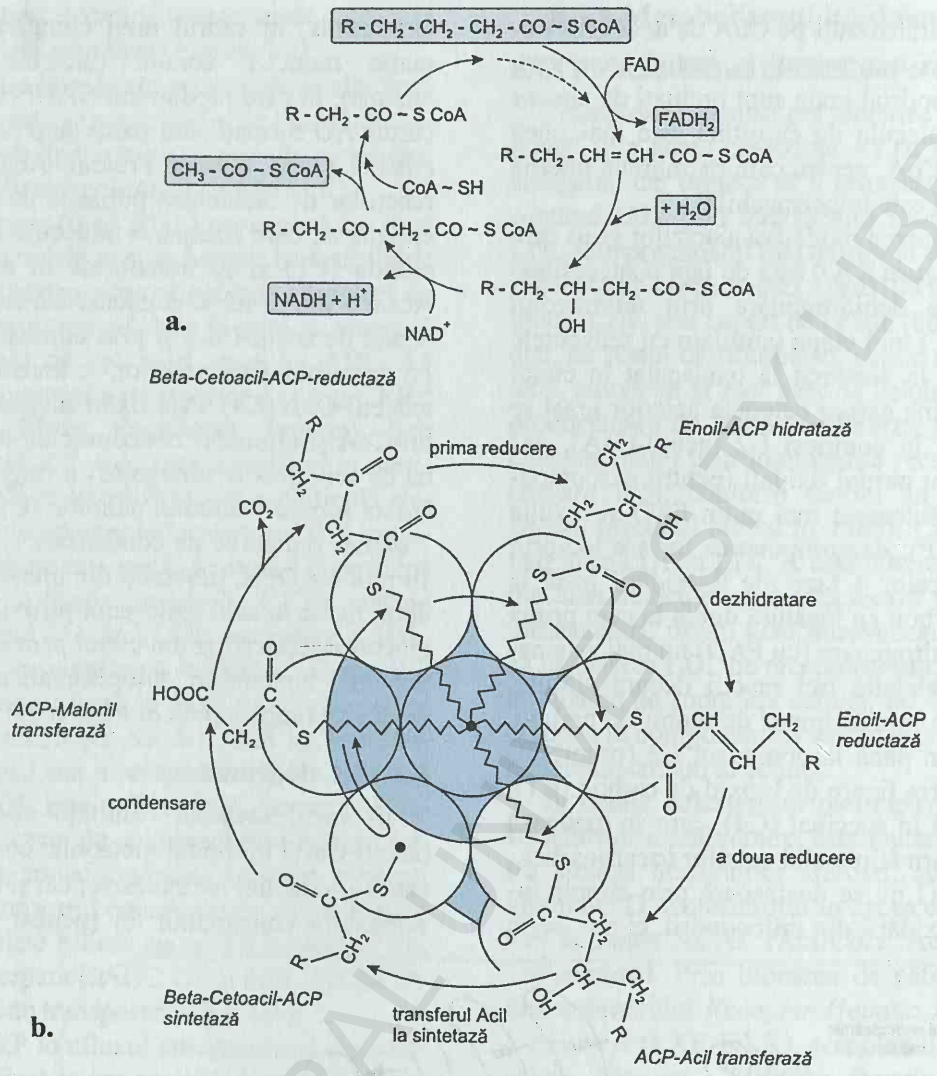


Figura 8.6. a). β oxidarea acizilor graşi; **b).** biosinteza acizilor graşi (*ACP = Acyl carrier protein*)

descompunere), în ficat aceştia se transformă în corpi cetonici (C4): acidul acetil-acetic şi acidul ß-hidroxi-butiric. În prima fază a cetogenezei, o moleculă de acetoacetil-CoA se condensează cu o moleculă de acetil-CoA, formând acidul ß-hidroxi-ß-metil-glutaril-CoA, prin eliberarea unei CoA libere. Produsul format pe de o parte reprezintă substratul primar al formării scheletului sterolic (colesterolului), iar pe de altă parte şi cel de-al cetogenezei. Printr-o scindare enzimatică, molecula acidului ß-hidroxi-ß-metil-glutaril-CoA se rupe într-o moleculă de acid acetil-acetic (corp cetonic) şi într-una de acetil-CoA, care intră din nou în ciclul cetogenezei. Acidul acetil-acetic liber se transformă ulterior prin reducere (NADH) în acid ß-hidroxi-butiric sau prin decarboxilare în acetonă, dar aceste transformări nu influenţează cu nimic toxicitatea substanţei.

8.4 Tulburări ale metabolismului lipidic - Dislipidemiile

Dislipidemiile sunt stări însoţite de modificări calitative şi / sau cantitative ale lipoproteinelor. Hiperlipidemiile sunt stări patologice caracterizate prin creşterea concentraţiei trigliceridelor şi / sau a colesterolului peste limitele acceptate ca normale pentru vârsta, sexul şi starea de sănătate a persoanei. Hipercolesterolemia izolată se caracterizează prin creşterea concentraţiei LDL, hipertrigliceridemia este rezultatul creşterii concentraţiei VLDL şi mai rar a chilomicronilor, iar în hiperlipidemia combinată sunt crescute concentraţiile LDL şi VLDL, mult mai rar a IDL (*Tabelul 8.III*).

Clasificarea patogenetică a dislipidemiilor cuprinde două clase principale:

1. Dislipidemii primare în care defectul interesează exclusiv sinteza şi / sau descompunerea

Tabelul 8.III. Grupele de hiperlipidemii în funcţie de concentraţiile colesterolului şi trigliceridelor

Grupul de hiperlipidemie	Lipidele serice (mg/dL)	
	Colesterol	*Trigliceride*
Hipercolesterolemii:		
• de graniţă	200-239 mg/dL	< 160 mg/dL
• moderate	240-300 mg/dL	< 160 mg/dL
• severe	> 300 mg/dL	< 160 mg/dL
Hipertrigliceridemii:		
• de graniţă	< 200 mg/dL	160-200 mg/dL
• moderate	< 200 mg/dL	200-400 mg/dL
• severe	< 200 mg/dL	> 400 mg/dL
Hiperlipidemii mixte/ combinate:		
• moderate	200-300 mg/dL	200-400 mg/dL
• severe	> 300 mg/dL	> 400 mg/dL

lipoproteinelor. Acestea pot fi cu *transmitere monogenică* (dominantă sau recesivă) sau cu *transmitere poligenică*, în care se întrepătrunde rolul factorilor metabolici endogeni şi de mediu.

2. Dislipidemii secundare, în care tulburarea echilibrului LP este o componentă a dezechilibrului metabolic care însoţeşte alte boli.

Fiecare entitate patogenetică se încadrează într-un anumit tip biochimic de dislipidemie. Datorită diagnosticului dificil al entităţii patogenetice, din punct de vedere practic se preferă clasificarea biochimică, bazată pe rezultatele analizelor de laborator.

8.4.1 Dislipidemiile primare

Dislipidemiile primare sunt determinate de obicei genetic sau în asociere de către factorii genetici şi efecte de mediu.

8.4.1.1 Clasificarea fenotipică

După Fredrickson se diferenţiază 6 tipuri de dislipidemii (tipul II are două subclase: a şi b, prezentate în *Tabelul 8.V.*

Această clasificare se bazează pe traseul electroforetic obţinut la migrarea în câmp electric şi aspectul serului după ce a fost păstrat la 4°C timp de 18-24 ore.

Tabelul 8.IV. Valorile maxime admise ale concentraţiei colesterolului total în funcţie de vârstă (National Health and Nutrition Examination Survey – NHANES şi Adult Treatment Panel ATP III)

Vârsta	Risc moderat (mg /dL)	Risc crescut (mg /dL)
2-19 ani	> 170	> 185
20-29 ani	> 200	> 220
30-39 ani	> 220	> 240
>40 ani	> 240	> 260

Diferenţierea simplă şi rapidă a dislipidemiilor

Tipul dislipidemiilor poate fi estimat cu o aproximaţie destul de bună cu ajutorul testului serului depozitat la rece. Pentru acest scop se recoltează 5 - 10 ml sânge pe nemâncate. Serul format se pune la frigider (4°C) 18 ore, într-o eprubetă aşezată vertical. Se apreciază transparenţa serului, aşezând un fond întunecat în spatele eprubetei. Pe baza absenţei transparenţei, prezenţei şi aspectului opalescenţei, se pot deosebi următoarele forme:

1. Ser clar, transparent: lipidemie normală sau prezenţa unei dislipidemii, care nu duce la apariţia opalescenţei, deci posibilitatea existenţei tipurilor IIa, IIb şi IV, cu creşterea cantităţii colesterolului (LDL) şi/sau uşoară a trigliceridelor serice (VLDL).
2. Strat (inel) lactescent la suprafaţă, cu serul inferior transparent: chilomicroni exogeni (tip I).
3. Opalescenţă difuză: creşterea trigliceridelor endogene (VLDL) sau a rămăşiţelor degradării lipidelor (tipurile III, IV sau IIb).
4. Strat (inel) lactescent la suprafaţă, cu serul inferior opalescent: creşterea simultană a chilomicronilor şi VLDL (tipurile III sau V).

Dislipidemia de tip I - Hipertrigliceridemie exogenă (hiperchilomicronemie)

Este o formă rară, caracterizată prin hipertrigliceridemie masivă cu prezenţa preprandială a chilomicronilor în plasmă. Forma primară este transmisă autozomal recesiv; defectul constă în incapacitatea de a metaboliza chilomicronii, dată de deficienţa LPL extrahepatice, sau a cofactorului său, ApoC-II. Poate apare şi secundar, în diabet zaharat şi disproteinemii. Se manifestă din copilărie prin hepatosplenomegalie, xantomatoză eruptivă, lipaemia retinalis şi pancreatite recurente. În ciuda nivelurilor mari de TG, afectarea vasculară prematură este rară.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 8.V. Clasificarea fenotipică a dislipidemiilor primare (Frederickson, 1967)

Tip	Denumirea	Ser	Lp	TG	Col	Simptomatologie
I	Hiperchilomicronemie	+++	Ch	+++	(+)/N	steatoză, *lipaemia retinalis*, pancreatită
IIa	Hipercolesterolemie izolată	clar	LDL	N	+++	xantelasme, gerontoxon
IIb	Hipercolesterolemie cu hipertrigliceridemie	(+) / clar	LDL, VLDL	++	++	xantelasme, inflamaţie microvasculară
III	Boala "benzii beta largi"	Clar/(++)	IDL	+++	+++	xantomatoză eruptivă
IV	Hiper-preβ-lipoproteinemie	++	VLDL	+++	+	hepatomegalie, xantoame
V	Forma mixtă ereditară	+++	Ch,VLDL, LDL	+++	+++	adipozitate, xantoame

Dislipidemia de tip IIa - Hipercolesterolemie izolată (creşterea fracţiunii LDL)

Este caracterizată prin hipercolesterolemie cu nivel normal de TG. Nivelul LDL este crescut, iar cel al VLDL normal. Cea mai cunoscută formă patogenică este *hipercolesterolemia familială (HF)*, cu transmitere autozomal dominantă (defectul este localizat pe cromozomul 19: 19p13.1-13.3). S-au descris cel puţin cinci clase de mutaţii care conduc la anomalii structurale sau funcţionale ale receptorului de LDL (afectând sinteza în RER, transportul proteinei în aparatul Golgi şi glicozilarea acesteia, defecte la nivelul regiunii aminoterminale de legare a Apo P, mutaţie punctiformă Y-807-C la capătul carboxil care inhibă internalizarea cuplului receptor-LP şi mutaţii care împiedică recircularea receptorului) consecinţa fiind incapacitatea îndepărtării corespunzătoare a LDL din circulaţie.

Acest tip de dislipidemie (IIa) poate apare şi secundar, la persoane cu dietă bogată în colesterol, boli hepatice obstructive, sindrom nefrotic, hipotiroidism. Se manifestă prin xantelasme, xantomatoză tendinoasă, gerontoxon şi ateroscleroză accelerată. Afectarea coronariană apare precoce, în decadele 3-4 de viaţă.

Dislipidemia tip IIb - Hiperlipemie mixtă (creşterea LDL şi VLDL)

Este caracterizată prin creşterea atât a LDL cât şi a VLDL. Patogenetic, numeroşi pacienţi cu acest fenotip de dislipidemie, au *hiperlipidemie familială combinată*, (HFC) cu transmitere autozomal dominantă; HFC este caracterizată prin prezenţa în antecedentele familiale atât a formei IIb, cât şi a formelor IIa (cu LDL crescut) şi IV (cu VLDL crescut) de dislipidemie. Secundar, apare în aceleaşi situaţii ca şi forma IIa. De obicei nu prezintă semne fizice. Predispune la ateroscleroză accelerată cu afectare coronariană.

Dislipidemia tip III - Disbetalipoproteinemie - Hiperlipemie mixtă (cu creşterea IDL)

Este o formă rară, caracterizată prin creşterea atât a colesterolului, cât şi a TG, dată de o particulă cu densitate intermediară între VLDL şi LDL cunoscută sub numele de IDL (intermediar density lipoprotein). Primar, poate fi datorată existenţei pe suprafaţa VLDL a unei apoproteine E (Apo E-2/E-2), care face imposibilă recunoaşterea şi metabolizarea acestei particule de către receptorii ţesuturilor periferice. Secundar, este asociată cu obezitate, hiperuricemie, hipotiroidism. Pacienţii prezintă xantomatoză palmară, tendinoasă şi risc crescut de boli vasculare coronariene sau periferice.

Dislipidemia tip IV - Hipertrigliceridemie izolată endogenă (creşterea VLDL)

Este relativ frecventă, putând apare pe fondul unei *hiperlipidemii familiale combinate*. O altă cauză primară o constituie *hipertrigliceridemia familială*, cu transmitere autozomal dominantă şi caracterizată prin creşterea VLDL, niveluri normale sau scăzute de LDL şi scăderea HDL. Atât creşterea producţiei, cât şi scăderea degradării contribuie la nivelurile mari de VLDL. Secundar, este asociată cu diabetul zaharat, hipotiroidie, insuficienţă renală, putând fi exacerbată de numeroşi factori de mediu, cum ar fi: dietă inadecvată, consum de alcool şi unele medicamente (beta blocante neselective, diuretice tiazidice, contraceptive orale).

Dislipidemia tip V - Hipertrigliceridemie endo- şi exogenă (creşterea Ch şi a VLDL)

Este caracterizată prin niveluri mari de TG, date de creşterea atât a chilomicronilor cât şi a VLDL, care dau plasmei un aspect lactescent. Secundar, apare la pacienţi obezi, cu diabet zaharat sau cu hiperuricemie. Se manifestă numai la adult prin xantomatoză eruptivă, hepato-splenomegalie, *lipemia retinalis*, pancreatită, fără să conducă prioritar la afectare vasculară.

Tabelul 8.VI. Cauze de creştere secundară a lipidelor

Colesterol crescut	Trigliceride crescute
Dietă	Obezitate
Hipotiroidism	Diabet zaharat
Boli hepatice	Consum abuziv de alcool
Sindrom nefrotic, transplant renal	Dietă bogată în hidraţi de carbon, bulimie
Porfirie	Sindrom nefrotic, insuficienţă renală cronică
Sarcină	Tratament estrogenic şi sarcină

Fenotipul se poate modifica la acelaşi pacient după un anumit tratament.

8.4.1.2. Clasificarea genetică şi metabolică a dislipidemiilor primare:

În dislipidemiile primare, defectul interesează exclusiv sinteza şi/sau descompunerea lipoproteinelor (LP). Acestea pot fi cu *transmitere monogenică* (dominantă sau recesivă) sau cu *transmitere poligenică*, în care se întrepătrunde şi rolul factorilor metabolici endogeni şi de mediu.

1. ***Hipercolesterolemia poligenică, comună*** (cauzată de interacţiunea unor factori genetici multipli, nedefiniţi, cu factori de mediu, comportamentali, în special alimentari) se caracterizează, din punctul de vedere al deficienţei metabolice, prin supraproducţie şi scădere a catabolismului LDL. În clasificarea Fredrickson, corespunde fenotipului IIa.

2. ***Hipercolesterolemia familială*** (deficienţă cantitativă sau calitativă a receptorului de LDL) se caracterizează prin scădere a catabolismului LDL - fenotipul IIa sau IIb.

3. ***Hiperlipidemia familială combinată*** (fără o cauză genetică unică şi clar delimitată, dar care are ca şi consecinţă o sinteză crescută de Apo B100) se caracterizează printr-o creştere a sintezei de VLDL şi LDL - fenotipul IIa, IIb sau IV.

4. ***Hiperlipidemia cu resturi lipoproteice*** (incompatibilitate structurală a Apo E2 - receptor ApoB100: ApoE) se caracterizează prin scădere a catabolismului IDL şi resturilor chilomicronice - fenotipul III.

5. ***Hipertrigliceridemia familială*** (cauză genetică primară necunoscută) se caracterizează prin niveluri crescute ale VLDL şi uneori ale chilomicronilor - fenotipul IV sau V.

6. ***Hiperchilomicronemia familială*** (cauzată de o deficienţă a LPL sau a cofactorului acesteia - Apo C II) = fenotipul I sau V.

7. ***Hipoalfalipoproteinemia familială*** - boala Tangier, cu deficit al transportului invers al colesterolului de la periferie la ficat, ca urmare a unei mutaţii la nivelul genei ABC A1.

8.4.2 Dislipidemii secundare

Un mare număr de afecţiuni şi situaţii patologice (*Tabelul 8.VI*), conduc la hiperlipidemii, în aceste cazuri tulburarea echilibrului LP fiind o componentă a dezechilibrului metabolic care însoţeşte afecţiunea. În unele cazuri (de exemplu în sindromul nefrotic şi hipotiroidism), hiperlipidemia este o regulă şi nu o excepţie.

Afecţiunile hepatice sunt însoţite, în 90% din cazuri, de dislipidemii:

- *bolile colestatice* (intra- sau extrahepatice) se asociază cu hipercolesterolemie, datorată apariţiei unei LP patologice - LP X ;
- *hepatitele acute severe* determină hipertrigliceridemie, probabil prin scăderea activităţii lipazei hepatice;
- *afecţiunile parenchimale avansate* (ciroze) sunt caracterizate de hipolipidemie, datorită scăderii sintezei hepatice a LP.

Afecţiunile renale se însoţesc de asemenea cu dislipidemii, care au un crescut potenţial aterogen:

- în *sindromul nefrotic* cu hipoalbuminemie uşoară, apare hipercolesteromie; hipoalbuminemia severă este însoţită de hiperlipidemie mixtă, cauzată probabil de cantitatea masivă de AGL captaţi de ficat prin deficienţa de albumină;
- în *insuficienţa renală cronică*, hiperlipidemia se datorează IDL şi VLDL, iar uneori scăderii HDL;
- după *transplantul renal*, tratamentul corticosteroidic utilizat timp îndelungat, conduce la hiperlipidemii mixte, moderate.

Mai multe clase de medicamente cu utilizare largă în populaţie, pot induce dislipidemii:

- ***diureticele de ansă*** pot cauza hiperlipidemie combinată, după utilizare îndelungată;
- ***beta-blocantele neselective*** cauzează hipertrigliceridemie (de obicei moderată) şi uneori scăderea HDL-colesterolului;
- ***tratamentele hormonale*** (corticosteroizi sau estroprogestative) sunt însoţite de dislipidemii mixte;
- ***retinoizii*** produc hipertrigliceridemie;
- ***medicamentele care induc enzimele microzomale hepatice*** (Fenitoin), produc creşterea HDL-colesterolului, uneori suficient pentru a determina o hipercolesterolemie moderată.

8.4.3 Examinări de laborator în dislipidemii

A. Recoltarea sângelui pentru analiză se face dimineaţa, după un post alimentar de 10-12 ore. Se recomandă 2-3 determinări separate efectuate la interval de mai mult de o săptămână, pacientul consumând regimul său alimentar uzual. Prezenţa unor afecţiuni severe (infarct miocardic acut, accident vascular cerebral) modifică tabloul lipidic, de asemenea tratamentul cu heparină, prin eliberarea LPL de pe endoteliul vascular.

B. Colesterolul total şi trigliceridele sunt dozările folosite în prima etapă de evaluare a riscului aterogen. Valori crescute ale unuia dintre aceşti parametri impun efectuarea analizei fracţiunilor colesterolului şi lipoproteinelor serice.

C. Analiza lipoproteinelor, presupune evaluarea separată a colesterolului conţinut în diverselе fracţiuni lipoproteice (HDL-colesterolul şi LDL-colesterolul). Se dozează în mod direct HDL-colesterolul, valoarea LDL-colesterolului fiind calculată indirect, pe baza formulei Friedewald:

LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – TG/5*

**TG/5 reprezintă colesterolul conţinut în VLDL (formula nu se poate aplica pentru TG>400 mg/dL)*

Determinarea proporţiei fracţiunilor lipoproteice (**lipidograma**) este absolut necesară doar pentru diagnosticul diferenţial al dislipidemiilor mixte (tipurile IIb, III şi uneori V), dar poate fi utilă şi atunci când nu există posibilitatea dozării directe a HDL-colesterolului, sau pentru identificarea prezenţei în cantitate crescută a Lp(a) – *Figura 8.7.*

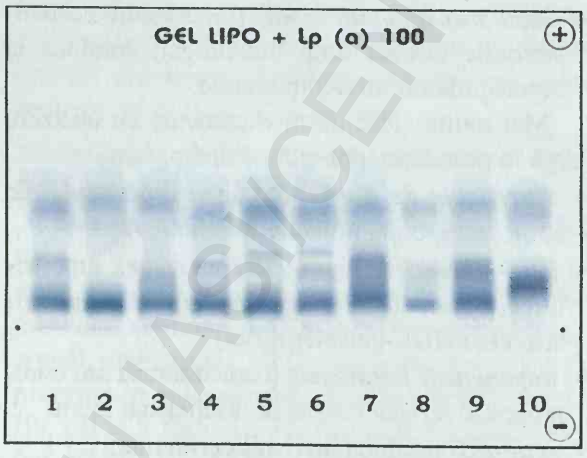


Figura 8.7. Electroforegramă lipoproteinică - dinspre anod spre catod: α1 LP, Lp(a), preβ LP, β LP, urme de chilomicroni în traseul 1; Lp(a) în traseele 6, 7; β larg în traseul 10

8.5 Factorii de risc aterogen - Ateroscleroza

Factorul de risc este o entitate definită ca orice determinant de natură genetică, ambientală sau comportamentală, dovedit prin studii epidemiologice retrospective sau prospective, ca fiind asociat cu incidenţa bolii aterosclerotice.

Există două mari clase de factori de risc aterosclerotic:

I. *Nemodificabili*: sexul masculin, vârsta, antecedente familiare sau personale aterosclerotice.

II. *Modificabili*:

- patologici: hiperlipidemia, diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, obezitatea;
- obiceiuri negative: fumatul, sedentarismul, dieta.

Termenul de factori de risc aterosclerotici implică o asociere statistică între un obicei, o stare patologică şi boala aterosclerotică (chiar dacă relaţia de cauzalitate nu este evidentă de la prima vedere). De exemplu concentraţia plasmatică a colesterolului creşte cu vârsta, iar boala coronariană aterosclerotică este prevalentă la adulţi. Până în prezent au fost identificaţi mai mult de 40 de factori de risc, cei mai importanţi fiind: hiper-/dislipidemiile, fumatul, hiper-tensiunea arterială, diabetul zaharat, obezitatea, sedentarismul, tulburările endocrine, menopauza, stress-ul, diete necorespunzătoare, duritatea scăzută a apei (lipsa sau cantitatea scăzută a microelementelor), infecţii bacteriene sau virale.

8.5.1 Lipidele, lipoproteinele şi implicarea lor în ateroscleroză

Hiperlipidemia este un factor de risc pentru boala aterosclerotică (prin colesterol dar şi trigliceride) şi pancreatite (prin trigliceride).

8.5.1.1 Hipercolesterolemia

Este un **factor de risc** pentru boala coronariană aterosclerotică, relaţia cauză-efect fiind demonstrată prin 5 tipuri de studii:

a. *Histopatologice*: leziunile aterosclerotice conţin LDL-colesterol.;

b. *Studii pe animale*: omul are nivelul colesterolemiei mai mare decât restul regnului animal şi raport LDL/HDL supraunitar. Dacă se induce hipercolesterolemie la animale ierbivore (iepuri, hamsteri) acestea dezvoltă însă ateroscleroză.

c. *Studii epidemiologice*: marile trialuri populaţionale au dovedit o creştere a mortalităţii prin boli cardiovasculare de la colesterolemie peste 150 mg/dL.

d. *Condiţii genetice*: Studiile lui Brown-Goldstein au arătat că hipercolesterolemia familială, caracterizată prin deficit de receptori pentru LDL, duce la creşterea nivelului plasmatic al LDL-colesterolului, ceea ce determină ateroscleroză prematură.

e. *Studii terapeutice*: scăderea colesterolemiei prin dietă sau tratament hipolipemiant scade incidenţa bolii coronariene direct proporţional cu scăderea concentraţiei colesterolului sanguin.

Rolul hiper- / dislipidemiilor în ateroscleroză este cert. Corelaţia pozitivă între concentraţia colesterolului şi incidenţa bolilor aterosclerotice a fost dovedită de studii multiple retrospective şi prospective, efectuate pe loturi populaţionale foarte mari. Acestea arată că între colesterolemie şi incidenţa bolii coronariene există o corelaţie pozitivă, riscul de instalare a bolii şi mortalitatea prin boală coronariană, fiind foarte crescute la concentraţii plasmatice ale colesterolului mai mari de 150 mg/dL. De asemenea s-a constatat că o scădere cu 10% a concentraţiei colesterolului, scade riscul de instalare a bolii coronariene la 50%. Studiile de profilaxie primară sau secundară, au demonstrat că la persoanele la care au fost tratate dislipidemiile, mortalitatea (de cauză cardiacă sau de altă cauză) a scăzut semnificativ.

Hipercolesterolemia datorată în special creşterii LDL (colesterolului LDL) este un factor de risc semnificativ şi independent pentru cardiopatia ischemică. Relaţia dintre colesterolemie şi cardiopatia ischemică este continuă, gradată şi curbilinie: riscul coronarian începe la valori de 150 mg/dL, creşte apoi moderat spre 200-250 mg/dL, pentru ca peste aceste valori creşterea să fie exponenţială. Nu există un prag de protecţie al colesterolemiei sub care să fie eliminat riscul coronarian.

Scăderea colesterolului HDL este de asemenea un predictor semnificativ şi independent al incidenţei cardiopatiei ischemice. Concentraţia scăzută a HDL-colesterolului, mai ales dacă se asociază cu hipertrigliceridemie, a fost constatată în special la fumători şi bolnavii diabetici, dar şi la persoanele obeze, sedentare, cu alimentaţie necorespunzătoare.

Hipertrigliceridemia are putere predictivă a riscului coronarian în special dacă se asociază cu nivele reduse ale colesterolului HDL. Acestea sunt componente ale ***sindromului X metabolic*** (definit ca asocierea toleranţei scăzute la glucide şi hiperinsulinemiei, cu HTA, sedentarism, obezitate, hiperuricemie, hipertrigliceridemie, hipocolesterolemie HDL, prezenţa LDL dense, de dimensiune mică, hiperlipemie postprandială persistentă, activitate crescută a inhibitorului activatorului plasminogenului PAI-1).

Raportul colesterol total / colesterol HDL, are certă valoare predictivă a riscului coronarian dacă valorile sunt mai mari sau egale cu 5; s-a utilizat anterior şi noţiunea de indice aterogen restrâns: colesterol LDL / colesterol HDL, care are valoare predictivă la valori > 3,5 la bărbaţi şi > 2,5 la femei.

Îmbunătăţirea statusului lipidic prin orice mijloace (dietă, exerciţiu fizic, tratament hipolipemiant, plasmafereză, by-pass ileal, transplant hepatic etc.), împiedică progresia leziunilor aterosclerotice la bolnavii cu boală coronariană. S-a formulat chiar o regulă în acest sens: **"Regula 2:1:1"** - scăderea cu 2% a LDL-colesterolului duce la scăderea cu 1% a riscului de instalare a bolii coronariene şi la o regresie cu 1% a leziunilor deja prezente.

8.5.1.2 Lipoproteinele cu densitate mică (LDL) şi lipoproteinele oxidate (LP_{ox})

Metabolismul intracelular al LDL, existenţa şi rolul receptorilor pentru aceste LP în membrana miocitului, fibroblastului şi celulei endoteliale, au fost descrise pentru prima dată de Brown şi Goldstein. Tema centrală a studiilor lor a fost hipercolesterolemia familială, cauzată de deficitul sau absenţa receptorilor pentru LDL. Incapacitatea celulelor de a internaliza LDL nu explică ateroscleroza accelerată pe care cei doi cercetători au observat-o la aceşti pacienţi. Această dilemă a fost rezolvată prin descoperirea faptului că LDL aterogene sunt de fapt nişte LP modificate (prin oxidare, glicozilare, acetilare etc.), care sunt avid captate de către sistemul fagocitar monocito-macrofagic, posesor al unor receptori speciali pentru aceste LP_{ox} (***"scavenger receptors"***); Goldstein a descris pentru prima dată în 1979 receptorul pentru LDL acetilat; spre deosebire de receptorii pentru LDL native, exprimarea membranară a acestor receptori nu este reglată de concentraţia intracelulară a colesterolului; astfel, fără feedback-ul negativ al acestei reglări, celulele se încarcă cu colesterol până la saturaţie şi se transformă în saci de grăsime inerţi funcţional (***"foam cells"***). Oxidarea LP poate avea loc atât extracelular cât şi intracelular; toate celulele implicate în aterogeneză pot oxida LP, dar macrofagele par cele mai active. Studiile aceloraşi cercetători au arătat că, spre deosebire de LDL_{ox}, LDL native nu produc celule spumoa-

se. Aterogenitatea LP_{ox} este datorată unor proprietăţi particulare ale acestora (*Figura 8.8*):

- sunt chemotactice pentru monocitele şi limfocitele T circulante (I) (prin activarea genei care codifică în celulele endoteliale factorul chemotactic proteic al monocitelor, MCP-1) şi chemostatice pentru macrofagele tisulare (II) (prin moleculele de lizolecitină generate în urma proceselor oxidative);
- sunt chemotactice pentru miocitele din media arterială şi stimulează producerea de factori de creştere (MG-CSF) şi citokine în endoteliul vascular;
- se acumulează "la saturaţie" în celulele spumoase (III) şi generează materialul centrului necrotic al plăcii aterosclerotice;
- sunt citotoxice pentru celulele endoteliale (IV). LDL_{ox}, dar şi LDL native, au efect inhibitor pe producerea şi acţiunea EDRF (NO) în peretele vascular, contribuind astfel la apariţia vasospasmului.
- activează limfocitele T (a căror prezenţă a fost dovedită atât în leziunile precoce, cât şi în cele tardive)
- activează limfocitele B – anticorpi anti LDL oxidat, de tip IgM şi IgG au fost identificaţi în plasmă.

Există studii experimentale care au dovedit rolul diverşilor antioxidanţi (Probucol, vitamina E, acidul ascorbic, β-carotenul) în scăderea riscului aterogen, din păcate rezultatele acestora nu au fost confirmate în studiile populaţionale.

8.5.1.3 Lipoproteinele cu densitate mare (HDL)

Date biochimice şi epidemiologice arată că HDL este un factor de risc pozitiv pentru ateroscleroză. Efectul protector se realizează printr-o eliminare secundară a colesterolului acumulat în periferie, prin sistemul de transport invers al colesterolului. Acest sistem scoate colesterolul din celulele spumoase, scade toxicitatea endotelială a LP_{ox}, protejează LDL de modificările oxidative şi exercită un efect benefic asupra peretelui vascular: creşte producţia de PGI_2 şi timpul de înjumătăţire al acesteia, stimulează proliferarea celulelor endoteliale şi răspunsul vasodilatator normal, dependent de endoteliul vascular (prin activarea NO sintazei).

8.5.1.4 Lipoproteina (a)

Concentraţia plasmatică a acestei LP este determinată genetic şi nu este influenţată de factori de mediu (precum concentraţia LDL). Datorită asemănării structurale dintre Apo(a) şi plasminogen, s-a sugerat că Lp(a) ar fi veriga de legătură între ateroscleroză şi tromboză: Lp(a) contribuie la aterogeneză atât prin componenta lipidică cât şi prin cea apolipoproteică, dacă se găseşte în concentraţie mai mare de 30 mg/dL.

8.5.2 Evaluarea globală a factorilor de risc cardiovascular

În puţine cazuri factorii de risc cardiovascular se prezintă individual, intens exprimat (de exemplu dislipidemiile familiale, genetice); de cele mai multe ori aceştia coexistă în interrelaţie ex-

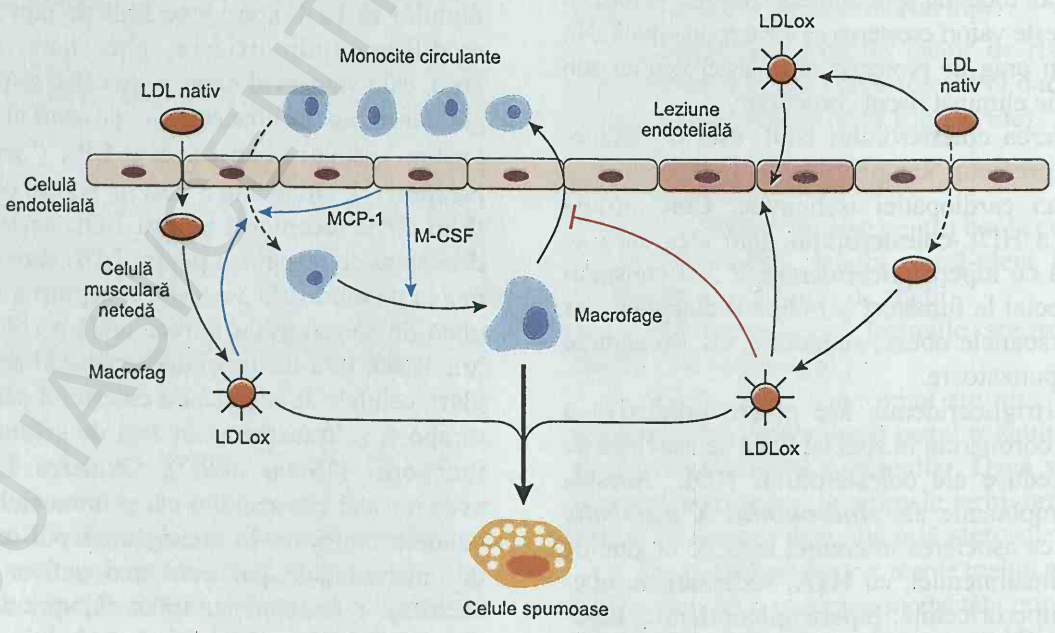


Figura 8.8. Mecanismele prin care LDL_{ox} iniţiază procesul aterosclerotic

ponenţială cu unele obiceiuri negative (fumatul, modul de alimentaţie neraţional, consumul exagerat de alcool şi cafea, sedentarismul etc.), factorii de mediu sau situaţii patologice care conduc la un status proaterogen (diabetul zaharat, afecţiunile hepatice, renale, disfuncţiile tiroidiene, hipertensiunea arterială etc.). De aceea este important să se facă o evaluare globală a stării de risc şi o cuantificare a acesteia, în vederea stabilirii conduitei terapeutice, precum şi pentru monitorizarea bolnavilor şi aprecierea eficienţei terapiei.

Societatea Europeană de Cardiologie a recomandat utilizarea unei diagrame pentru aprecierea riscului cardiovascular global, în următorii 10 ani, la persoane aparent sănătoase. Grilele SCORE (*Figura 8.9*) operează cu următorii factori: sex, vârstă, fumat, colesterolemie şi valorile tensiunii arteriale sistolice, la care s-au adăugat ulterior şi alţi factori de risc. Riscul individual se obţine prin depistarea careului corespunzător vârstei, sexului, valorii tensiunii arteriale, colesterolemiei şi stării de fumător sau nefumător a persoanei în cauză.

Factorii amintiţi dau un risc cardiovascular individual, absolut, interpretabil, până la valoarea de 40%. Prezenţa unor factori de risc suplimentari (obezitate, hipertrigliceridemie, sindrom metabolic, diabet zaharat), modifică riscul în sensul creşterii acestuia; excepţie face hiperHDL (peste 60 mg/dL) care poate scădea riscul cardiovascular. Astfel este posibilă o cuantificare mai complexă şi în acelaşi timp, mai aproape de realitate a riscului cardiovascular global. Importanţa diagramei rezidă nu numai

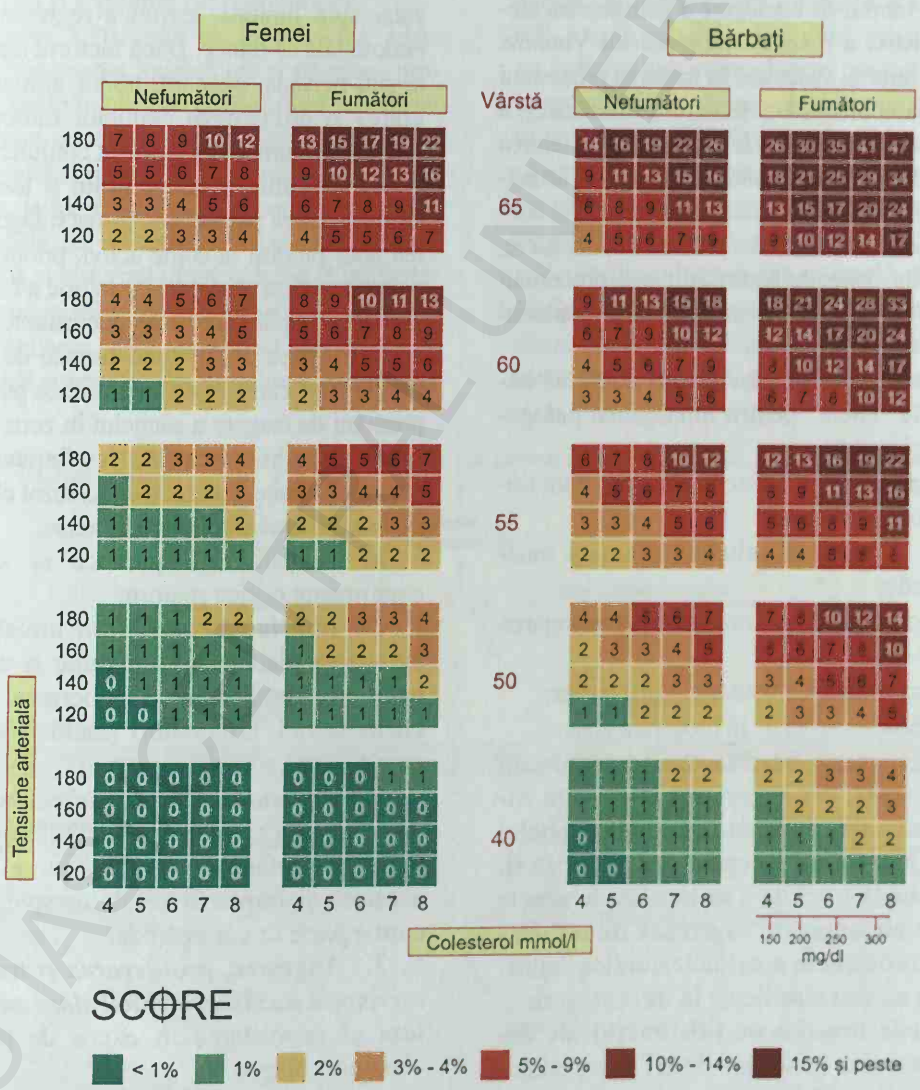


Figura 8.9. Grilele SCORE pentru cuantificarea riscului global de eveniment cardiovascular fatal pe o perioadă de 10 ani în ţările europene cu risc crescut, se bazează pe următorii factori de risc: sex, vârstă, fumat, tensiunea arterială sistolică şi colesterolul total

în aprecierea gradului de risc, dar şi în monitorizarea evoluției acestuia, prin efortul de corectare a factorilor de risc. Pentru țările din regiunea mediteraneană se utilizează o diagramă de interpretare a riscului cardiovascular mai puțin severă, având în vedere tradițiile culinare.

Dacă persoana are deja o boală cardiovasculară manifestă clinic, riscul global de evenimente cardiovasculare este considerat peste 40%.

8.5.3 Concepția actuală asupra etiopatogeniei aterosclerozei - Teoria răspunsului peretelui vascular la agresiune

Teoria multifactorială a aterogenezei pare a fi cea mai plauzibilă dintre teoriile formulate până în prezent, ea fiind susținută de efectul aditiv şi sinergic al factorilor de risc cardiovascular. Noile descoperiri au modificat modul de înțelegere a patogenezei aterosclerozei: Ross a reactualizat ideea lui Virchow privind rolul injuriei vasculare în inițierea procesului aterogen şi combinând-o cu teoria lui Rokitansky, a propus ***"teoria răspunsului la leziune".*** Deosebirea majoră față de teoria originală este aceea că actualmente se consideră că denudarea endotelială şi aderarea plachetelor cu eliberarea factorilor de creştere, nu sunt absolut necesare pentru inițierea procesului aterogen; perturbarea homeostaziei peretelui arterial este suficientă pentru aceasta.

Teoria modernă a aterosclerozei combină câteva concepte "cheie" pentru înțelegerea patogenezei aterosclerozei:

- importanța injuriei (structurale sau funcționale) peretelui vascular;
- răspunsul la injurie al celulelor imune şi musculare netede;
- rolul LP circulante în inițierea şi propagarea leziunilor;
- funcția factorilor de creştere şi citokinelor;
- rolul trombozelor repetate în progresia leziunii.

Interrelația exactă între factorii determinanți nu este cunoscută, dar importanța integrității endoteliale pentru funcționarea normală a peretelui vascular este unanim acceptată de cercetători. Tendința leziunilor AS de a se localiza la zonele de bifurcație ale arterelor, sugerează rolul fluxului sanguin turbulent în apariția leziunilor. Injuriile vasculare au fost clasificate în trei categorii:

I. **Alterările funcționale (disfuncții) ale endoteliului vascular** (potențate de HTA, hiperlipoproteinemii, glicozilări neenzimatice ale LP şi proteinelor sanguine şi endoteliale, prezența lipoproteinelor oxidate, a complexelor imune circulante, a substanțelor nocive din fumul de țigară, homocisteinei, dezechilibre ale balanței coagulare - anticoagulare – fibrinoliză), duc la retenția LP în lipozomi extracelulari şi acumularea macrofagelor. Chiar modificări minore, aparent nesemnificative, ale structurii endoteliale (Exemplu: perturbarea suprafeței cationice a glicocalixului de către LDL, apariția unor molecule de adeziune pentru monocite, limfocite şi plachete), pot altera interacțiunea celulelor endoteliale între ele şi cu țesutul conjunctiv subiacent şi inițiа procesul aterogen.

II. **Denudarea endoteliului** (cu lamina elastică internă şi media intacte) atrage plachetele sanguine, limfocitele şi macrofagele, care produc şi eliberează diverse substanțe - factori de creştere şi citokine. Succesiunea de mai sus nu conduce invariabil la instalarea plăcii AS. Dacă injuria şi răspunsul tisular sunt limitate, leziunea regresează şi bariera endotelială se reface. Dacă factorul agresiv se repetă sau persistă, apar infiltrarea intimei cu LP, migrarea şi proliferarea celulelor musculare netede, sinteza şi acumularea de țesut conjunctiv.

III. **Denudarea endoteliului şi lezarea intimei**, cu acumularea plachetelor şi macrofagelor şi eliberarea unor produşi biologic activi, printre care colagenaza şi elastaza. Acest tip de injurie a fost descris mai ales în cazul plăcilor AS deja constituite, leziunile minore (fisurarea plăcii) fiind urmate de apariția unor trombi mici care cresc dimensiunea plăcii. Creşterea presiunii de curgere a sângelui în zona afectată duce la ruperea şi dislocarea plăcii, cu formarea unui tromb masiv, obstruant, fenomen concretizat clinic prin apariția sindroamelor coronariene acute.

În instalarea AS precoce se succed patru evenimente critice majore:

1. ***Injuria vasculară***, este urmată imediat de agregarea plachetelor sanguine şi aderarea monocitelor circulante, cu eliberarea unor factori chemotactici, inflamatori (inclusiv specii reactive ale oxigenului) şi mitogeni.

2. ***Acumularea de lipide*** extracelular şi intracelular (în celulele endoteliale, musculare netede, macrofage) cu modificarea oxidativă a acestora şi formarea celulelor spumoase, dintre care o parte se vor necroza.

3. ***Migrarea, proliferarea şi transformarea secretorie a celulelor musculare netede***, cu sinteza şi depozitarea în exces de proteoglicani, elastină, colagen.

4. ***Sinteza de țesut conjunctiv*** determină indurarea componentelor, fixarea calciului şi ulcerația ulterioară a plăcii AS.

Studii mai recente au clarificat şi unele aspecte ale mecanismului molecular al AS:

- Ataşarea plachetelor sanguine şi a monocitelor la endoteliul aparent intact depinde, se pare, de interacţiunea unor glicoproteine de suprafaţă cu situsurile de legare ale endoteliului vascular.
- După aderarea şi migrarea în spaţiul subendotelial, monocitele se transformă în macrofage şi produc o serie de substanţe care participă la evoluţia AS: factori chemotactici, mitogeni şi inflamatori (prostaglandine - PG, leucotriene - LT, interleukine - IL, bradikinina - BK, serotonină - 5HTA, histamină - His-NH2, factorul de necroză tumorală - TNF, factorul de creştere derivat din plachete - PDGF), enzime (proteaze, oxigenaze, colagenaze, elastaze), radicali liberi (produc citoliză endotelială şi oxidarea LP plasmatice).
- Oxidarea LDL este un proces care poate afecta atât componenta lipidică cât şi pe aceea proteică, consecinţele în plan funcţional fiind deosebite; LP oxidate sunt citotoxice şi imunogene: inhibă relaxarea dependentă de endoteliu a musculaturii netede vasculare, induc formarea şi eliberarea de endoteline, molecule de adeziune, factori chemotactici dar stimulează şi sistemul imun specific (Limfocitele T şi B – produc anticorpi anti LP oxidate).
- Glicozilarea este un aspect particular al modificării LP şi proteinelor circulante plasmatice şi din componenţa peretelui arterial (*Figura 8.10*); LDLglc stimulează agregarea plachetară şi formează legături covalente cu proteinele peretelui arterial; HDLglc împiedică efluxul colesterolului din celule; glicozilarea colagenului creşte rigiditatea peretelui arterial, stimulează aderarea LP şi activează macrofagele; glicozilarea proteinelor circulante formează antigene împotriva cărora organismul generează autoanticorpi, iar complexele imune circulante vor determina alte leziuni arteriale.

În **concluzie,** aterogeneza este un proces multifactorial, care evoluează în etape multiple, iar celulele peretelui vascular mediază activ trei statusuri: homeostatic, stabil şi patobiologic. Răspunsul acestor celule la injurie este mediat printr-o varietate de procese disponibile celulelor: aderare şi comunicare intracelulară (factori solubili, joncţiuni), contractilitate, migrare, proliferare, inflamaţie, mineralizare, necroză, modularea permeabilităţii, hemostazei, activităţii plachetare, modulare fenotipică etc. Prin activarea sau modularea unuia sau mai multora dintre aceste procese, celulele promovează restabilirea homeostaziei sau realizarea unui nou status stabil (striurile lipidice, îngroşarea intimală difuză, modificările datorate vârstei etc.). Injuriile care vor urma conduc peretele vascular, printr-o serie de etape cu o relativă stabilitate (plăcile fibroase),

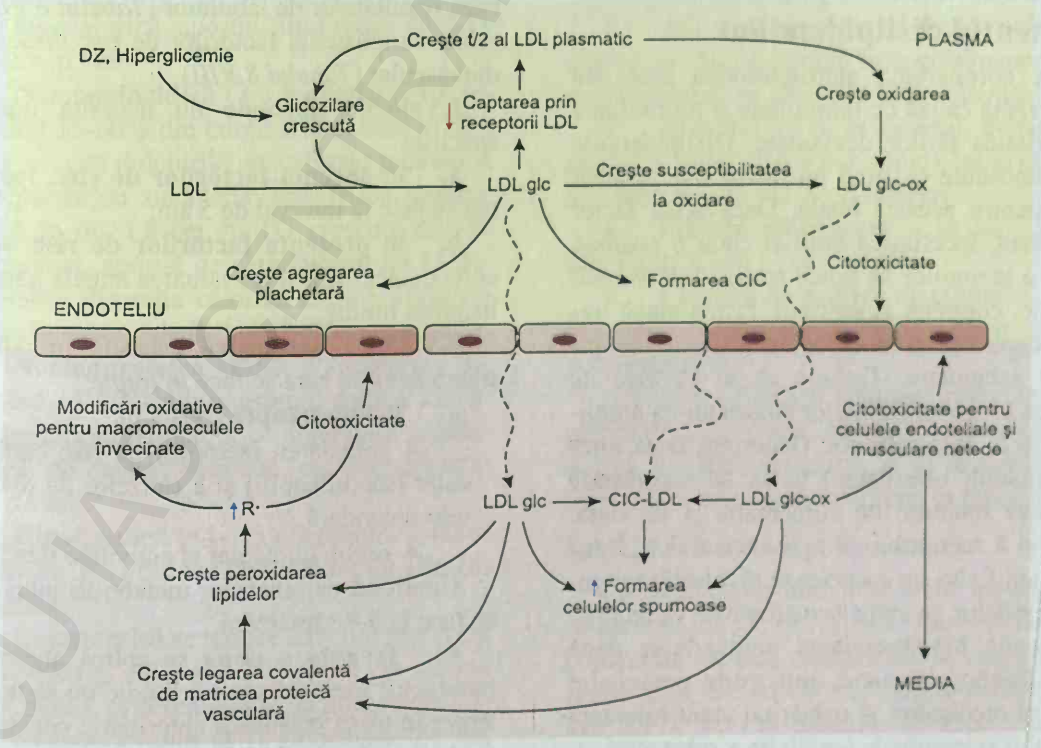


Figura 8.10. Mecanismul prin care glicozilarea accelerează ateroscleroza la diabetici

Tabelul 8.VII. Interpretarea valorilor parametrilor metabolismului lipidic, în funcţie de riscul cardiovascular, determinat de prezenţa factorilor de risc ATP III (*vezi şi Tabelul 8.VIII*)

Parametrul	Valori patologice	Valori critice*
Colesterol total		
Indivizi cu risc scăzut	> 240 mg/dL (6,21 mM)	> 260 mg/dL (6,72 mM)
Indivizi cu risc crescut**	> 200 mg/dL (5,17 mM)	> 240 mg/dL (6,21 mM)
Indivizi cu boală AS***	> 180 mg/dL (4,65 mM)	> 200 mg/dL (5,17 mM)
LDL-Colesterol		
Indivizi cu risc scăzut	>160 mg/dL (4,14 mM)	>190 mg/dL (4,91 mM)
Indivizi cu risc crescut	>130 mg/dL (3,36 mM)	>160 mg/dL (4,14 mM)
Indivizi cu boală AS	>100 mg/dL (2,59 mM)	>130 mg/dL (3,36 mM)
HDL-Colesterol		
Indivizi cu risc scăzut	<35 mg/dL (0,91 mM)	<30 mg/dL (0,78 mM)
Indivizi cu risc crescut	<40 mg/dL (1,03 mM)	<35 mg/dL (0,91 mM)
Indivizi cu boală AS	<45 mg/dL (1,16 mM)	<40 mg/dL (1,03 mM)
Trigliceride		
Indivizi cu risc scăzut	>180 mg/dL (2,06 mM)	>500 mg/dL (5,71 mM)
Indivizi cu risc crescut	>160 mg/dL (1,83 mM)	>200 mg/dL (2,29 mM)
Indivizi cu boală AS	>135 mg/dL (1,54 mM)	>200 mg/dL (2,29 mM)

** Valorile critice sunt acele valori la care există risc de ateroscleroză accelerată, necesitând introducerea de tratament intensiv, inclusiv medicaţie hipolipemiantă.*

*** Persoane la care sunt prezenţi factori de risc indicaţi în Tabelul 8.VIII.*

**** Antecedente personale de boli cardiovasculare aterosclerotice (profilaxie secundară).*

la stadiul în care diverse evenimente pot produce dezechilibrul: hemoragii în placă cu apariţia fenomenelor clinic manifeste: sindroamele vasculare acute (coronariene, periferice sau cerebrale).

8.6 Considerente privind tratamentul dislipidemiilor

Boala coronariană aterosclerotică este cea mai frecventă cauză de mortalitate şi morbiditate în majoritatea ţărilor dezvoltate. Dislipidemiile sunt recunoscute ca fiind un factor independent de risc pentru această boală. Dacă acest factor este prezent, încetinirea bolii şi chiar o posibilă regresie a leziunilor se poate realiza intervenind sistematic, complex şi susţinut. Prima etapă trebuie să depisteze şi să corecteze cauzele dislipidemiilor secundare. Trebuie să se verifice de asemenea prezenţa factorilor cunoscuţi ca amplificând riscul aterosclerotic (hipertensiunea arterială, fumatul, obezitatea) şi să se recomande schimbarea modului de alimentaţie şi de viaţă, precum şi a regimului de activitate fizică. Dacă aceste modificări nu corectează nivelurile sanguine ale lipidelor, în etapa următoare se va recurge la medicaţia hipolipemiantă ghidându-se după profilul lipidic plasmatic, anticipând potenţialul benefic al medicaţiei şi urmărind atent toleranţa pacientului şi eventuala toxicitate a substanţei.

8.6.1 Obiectivul tratamentului

Este aducerea parametrilor metabolismului lipidic la valorile normale (vezi „Risc scăzut", *Tabelul 8.VII*) şi stabilizarea plăcilor de aterom instabile. Conducerea tratamentului se face pe baza rezultatelor de laborator (*Tabelul 8.VII*), corelate cu existenţa factorilor de risc crescut cardiovascular (*Tabelul 8.VIII*).

1.Valorile normale nu necesită tratament specific:

a. în **absenţa factorilor de risc**, reevaluarea se face la interval de 5 ani;

b. în **prezenţa factorilor de risc**, se face corecţia acestora şi reevaluarea anuală a metabolismului lipidic.

2.Valorile patologice necesită introducerea tratamentului, care se face *în trepte*:

a. Prima treaptă constă în:

- corectarea factorilor de risc cardiovascular (modificabili) şi a cauzelor de dislipidemie secundară.
- regim alimentar şi activitate fizică.

Controlul parametrilor metabolismului lipidic se face la 6-8 săptămâni.

b. Treapta a doua se aplică atunci când parametrii metabolismului lipidic nu se normalizează în urma măsurilor anterioare; constă în introducerea în plus şi a medicaţiei hipolipemiante.

Tabelul 8.VIII. Factorii de risc cardiovascular asociaţi dislipidemiilor:

1. Bărbaţi cu vârste peste 45 de ani
2. Femei postmenopauză
3. Fumatul
4. Hipertensiunea arterială
5. Diabetul zaharat
6. Obezitate severă (peste 30% faţă de greutatea ideală)
7. Antecedente familiale de ateroscleroză înainte de 60 de ani

3.Valorile critice necesită introducerea de la început a tuturor măsurilor terapeutice, inclusiv a tratamentului medicamentos hipolipemiant.

8.6.2 Corectarea factorilor de risc

Corectarea factorilor de risc necesită în primul rând tratamentul riguros şi corect al bolilor care predispun la dislipidemie: diabet zaharat, hipotiroidism, obezitate, boli hepatice sau renale. Se vor evita diureticele tiazidice şi beta-blocantele neselective, deoarece acestea cresc raportul LDL/HDL. La femei în postmenopauză, se ia în discuţie în anumite situaţii tratamentul hormonal de substituţie.

8.6.2.1 Regimul alimentar şi de viaţă

Este obligatoriu în toate cazurile de dislipidemie, dar nu numai. Caracteristicile generale ale dietei în dislipidemii sunt următoarele:

1. **Normocalorică**, conţinând aproximativ 30 - 35 kcal / kg corp / zi. La supraponderali dieta va fi hipocalorică, aportul fiind redus cu 5-15 kcal / kgcorp / zi.

2. **Normoglucidică** (3-3,5 g/kgcorp/zi), reprezentând 55-60% din conţinutul caloric al dietei. Se vor evita dulciurile concentrate precum şi cele preparate cu smântână, unt, frişcă, untură, gălbenuş de ou. La cei cu TG crescute sau cu diabet zaharat, aportul de carbohidraţi nu va depăşi 50-60% din raţia calorică zilnică, fiind reprezentat în special de carbohidraţi complecşi.

3. **Normoproteică** (1-1,5 g/kgcorp/zi), reprezentând 15-20% din consumul caloric zilnic. Se vor prefera proteinele uşor digerabile şi îndeosebi cele de origine vegetală, cu efect hipocolesterolemiant.

4. **Hipolipidică** (<1-1,5 g/kgcorp/zi), adică mai puţin de 30% din conţinul caloric al alimentaţiei zilnice.

a. **Colesterolul** se reduce sub 300 mg/zi (în prima treaptă) şi chiar sub 200 mg/zi (în treapta a II-a de dietă), prin renunţarea la alimentele bogate în colesterol, cum ar fi gălbenuşul de ou, untul, smântâna, frişca sau viscerele de animale.

b. **AG saturaţi** se reduc sub 10% din totalul raţiei calorice în prima treptă de dietă şi sub 7% în treapta a doua. Pentru aceasta se evită carnea grasă, iar carnea de pasăre se consumă fără piele. Laptele se consumă degresat, evitându-se laptele integral, smântâna, untul şi brânzeturile fermentate (datorită conţinutului ridicat în cistină). Sunt interzise grăsimile solide, bogate în AG saturaţi şi cele modificate prin tratament termic, care desface parţial dublele legături şi formează radicali liberi.

c. **AG polinesaturaţi** se suplimentează până la 20% din raţia calorică zilnică, prin:
- consumul de uleiuri vegetale (porumb, floarea soarelui, soia, măsline) bogate în acid linoleic; există actualmente uleiuri vegetale speciale cu conţinut bogat în AG mono- şi polinesaturaţi şi vitamine liposolubile A şi E, cu efect antioxidant.
- consumul de peşte; uleiul de peşte oceanic este utilizat actualmente şi ca medicament hipotrigliceridemiant.

d. **AG mononesaturaţi** (acidul oleic), par a avea un efect favorabil în special asupra HDL-colesterolului; se găsesc în uleiul de măsline.

5. **Alcoolul** va fi, în general, evitat (maximum 25-30 ml alcool pur zilnic), iar la cei cu valori crescute ale TG, va fi interzis.

6. **Fibrele alimentare** - se vor consuma minimum 30-40 g / zi.

7. **Clorura de sodiu** - maximum 4,5-5 g/zi (jumătate din această cantitate şi chiar mai puţin la hipertensivi).

Activitatea fizică şi scăderea în greutate la supraponderali şi obezi, au efect benefic nu numai asupra lipidelor sanguine, ci şi în normalizarea tensiunii arteriale şi a toleranţei la glucoză.

8.6.2.2 Medicaţia hipolipemiantă

Recomandarea unui tratament hipolipemiant se face în funcţie de valorile parametrilor metabolismului lipidic, interpretate în contextul prezenţei altor factori de risc cardiovascular (*Tabelele 8.VII, 8.VIII*), precum şi după eliminarea cauzelor posibile de dislipidemie secundară sau

Tabel 8.IX. Efectele medicaţiei hipolipemiante asupra diferitelor tipuri de lipoproteine

Preparatul	LDL-C	HDL-C	TG
Rezine	↓↓↓	–	–/↑
Fibraţi	↑↓	↑↑	↓↓
Statine	↓↓↓↓	–/↑	↓
Acid nicotinic	↓↓	↑↑	↓↓
Ezetimib	↓↓	–	–
Ulei de peşte	–/↑	–/↑	↓↓↓

a tratamentului incorect al acestora (*Tabel 8.VI*). Se cunosc cel puţin 6 clase de hipolipemiante, alegerea acestora făcându-se anticipând beneficiul tratamentului în funcţie de tabloul lipidic, de patologia anexată a pacientului şi de toxicitatea potenţială a preparatului (*Tabelele 8.IX, 8.X*).

Sechestranţi de acizi biliari - Răşinile schimbătoare de ioni (Colestyramina, Colestipol)

a. Farmacologie. Colesterolul reprezintă substratul pentru sinteza acizilor biliari în ficat. Rezinele sunt răşini schimbătoare de ioni, insolubile şi nedigerabile, care leagă acizii biliari în intestin şi întrerup circuitul enterohepatic al acestora, stimulând astfel utilizarea în ficat a colesterolului. Ca urmare activitatea receptorilor pentru LDL-colesterol din celula hepatică este crescută, fiind accelerat turnoverul LDL-colesterolului, cu scăderea nivelului sanguin al acestuia; aceste medicamente nu sunt deci eficiente la persoanele cu deficienţă familială (homozigotă) de receptori pentru LDL. Valorile TG pot să crească. Efectul rezinelor se manifestă după 4-5 zile de terapie, iar efectul maxim (dependent de doză) apare la aproximativ 6 săptămâni de la începutul tratamentului.

b. Utilizare clinică. Rezinele reprezintă medicamente preferate în pediatrie şi la femei în perioada activă pentru procreere pentru cazurile de creştere izolată a LDL-colesterolului (dislipidemia de tip IIa). ***Efectele adverse*** cele mai frecvente sunt de natură gastro-intestinală: constipaţia, colici abdominale, balonare, greaţă. Interferează cu absorbţia tiazidelor, digitalicelor, cumarinicelor, betablocantelor, statinelor şi vitaminelor liposolubile; aceste medicamente trebuie administrate cu cel puţin 1 oră înainte, sau cu 4 ore după rezine.

Inhibitori ai absorbţiei colesterolului din intestinul subţire - Ezetimib

a. Farmacologie. Acţionează la nivelul marginii în perie a intestinului subţire, inhibând absorbţia colesterolului şi fitosterolilor. Consecinţa este creşterea preluării hepatice a colesterolului plasmatic (mecanism complementar cu cel al statinelor). Timpul de înjumătăţire este de 20-24 ore şi nu se metabolizează dependent de citocromul P_{450}.

b. Utilizare clinică. Este indicat în hipercolesterolemii izolate, în doză unică zilnică, asociat sau nu cu statine, în funcţie de ţinta terapeutică, rezultatul fiind aditiv. Efectele asupra TG şi HDL-C sunt modeste. ***Efectele adverse*** se datorează suprasaturării bilei cu colesterol – pericolul apariţiei litiazei biliare.

Inhibitorii CETP (Torcetrapib şi Anacetrapib)

a. Farmacologie. Acţionează prin blocarea CETP, proteina care transferă esterii de colesterol de pe HDL (sau LDL) pe VLDL, la schimb cu TG. Inhibarea CETP sistează teoretic conexiunea dintre căile aterogenă şi antiaterogenă, crescând afluxul de CE dinspre periferie spre ficat, pentru eliminarea acestuia.

b. Utilizare clinică. Este indicat în hipercolesterolemie, mai ales dacă este însoţită de nivele scăzute ale HDL şi crescute ale TG (în contextul sindromului metabolic). Dezvoltarea Torcetrapibului a fost oprită în 2006 în faza III deoarece a arătat un exces de mortalitate generală la grupul tratat cu atorvastatin şi torcetrapib (se pare prin HTA indusă de activarea sistemului RAA). Probabil că efectul secundar obţinut nu este unul de clasă, deoarece nu a fost raportat şi pentru Anacetrapib, care este încă în dezvoltare.

Fibraţii (Fenofibrat, Bezafibrat, Gemfibrozil)

a. Farmacologie. Derivaţii acidului fibric stimulează activitatea lipoprotein-lipazei (LPL) şi scad sinteza hepatică a VLDL; prin urmare scade nivelul sanguin al VLDL şi deci al TG. HDL-colesterolul creşte, iar modificarea LDL-colesterolului este variabilă. În plasmă toţi fibraţii se leagă competitiv de proteine (mai ales de albumină), eliberând anticoa-

Tabelul 8.X. Alegerea medicaţiei hipolipemiante, în funcţie de parametrii metabolismului lipidic (medicaţia este notată în ordinea preferinţelor)

LDL-C	HDL-C	TG	Clasa de Medicaţie
↑	N	N	Statine - Rezine - Acid nicotinic - Probucol
↑	N/↓	↑	Fibraţi - Statine - Acid nicotinic
N	N/↓	↑	Fibraţi - Statine - Acid nicotinic - Ulei de peşte
N	↓	N	Acid nicotinic-Fibraţi -Statine

gulantele orale şi potenţând astfel efectul lor. **Fenofibratul** se absoarbe rapid şi se activează în plasmă prin transformare hidrolitică în acid fenofibric; are timpul de înjumătăţire de aproximativ 20 de ore. **Bezafibratul** creşte HDL prin stimularea sintezei de Apo AI şi AII, creşte LDL la persoanele cu hipertrigliceridemie (prin activarea LPL) şi scade concentraţia plasmatică a fibrinogenului. Efectele fibraţilor se realizează prin intermediul PPARα (Peroxisome Proliferation Activating Receptors α) PPARα sunt de fapt factori de transcriptie genică. Odată activaţi de un ligand (fibraţii, de exemplu) ajung la nivel nuclear unde interacţionează (dimerizează) cu un alt receptor nuclear RXR (Retinoid X Receptor), afectând transcripţia unor gene ţintă în metabolismul lipoproteinelor şi acizilor graşi: declanşează transcrierea genelor Apo AI, Apo AII, LPL, enzimelor beta-oxidării mitocondriale a acizilor graşi şi blochează transcrierea Apo CIII.

Gemfibrozilul este un hipotrigliceridemiant foarte eficient (stimulează LPL şi scade sinteza VLDL şi ApoB în ficat), fiind indicat mai ales la persoanele cu forme severe. Medicamentul are un circuit enterohepatic (se reabsoarbe de câteva ori), principala cale de eliminare fiind cea urinară.

b. Utilizare clinică. Fibraţii sunt medicamentele preferate pentru cazurile cu TG crescute (tipul III, IV, V de dislipidemie). ***Efectele adverse*** includ colici abdominale, diaree, greaţă, cefalee, miozite şi favorizarea formării de calculi biliari şi urinari. Pe parcursul tratamentului se urmăresc valorile transaminazelor şi fosfatazei alcaline (existând riscul de afectare hepatică), precum şi creatin kinaza (pentru a depista afectarea musculară). Intrucât eliminarea se face prin urină, insuficienţa renală necesită reducerea dozelor (în funcţie de concentraţia plasmatică a creatininei). Fibraţii potenţează efectul fenitoinei, tolbutamidei, cumarinicelor. Sunt ***contraindicate*** în insuficienţa renală acută şi boala litiazică.

Statinele

a. Farmacologie. Cel mai recent grup de medicamente hipolipemiante - Statinele - sunt inhibitori ai 3-hidroxi, 3-metil glutaril coenzimă A (HMG CoA) reductazei, enzima cheie în biosinteza hepatică a colesterolului. Scăderea nivelului colesterolului în celula hepatică, stimulează sinteza de receptori membranari pentru LDL-colesterol. De asemenea scad TG şi creşte (variabil) HDL-colesterolul. Legarea de HMG CoA reductază este specifică şi reversibilă, iar rata de sinteză a hormonilor steroizi nu este afectată. Absorbţia intestinală se face în proporţie de 30%, cea mai mare parte fiind captată în ficat (90% pentru Lovastatin şi Simvastatin, iar pentru Pravastatin aproape 100%), epurată pe cale biliară şi doar o mică parte circulă legată de proteinele plasmatice. Nu sunt eficiente la persoanele cu hipercolesterolemie familială homozigotă şi la persoanele cu deficit de ApoB-100.

Reacţiile inflamatorii în plăcile de aterom joacă un rol important în patogeneza evenimentelor aterotrombotice acute. Statinele au se pare şi efecte pleiotrope (anti-inflamator şi imunomodulator), independente de efectul hipocolesterolemiant. O serie întreagă de procese imunologice ar putea fi influenţate de statine: nivelul sICAM1 şi expresia receptorilor acestuia pe suprafaţa celulelor mononucleate periferice, capacitatea acestora de a produce citokine şi de asemenea nivelurile serice ale usCRP (PCR determinată prin metode ultrasenzitive – domeniul de valori: 3-15 mg/L), peroxizilor lipidici şi alţi parametri inflamatori, consecinţă a efectului anti-inflamator. Deoarece ateroscleroza este o boală inflamatorie în toate stadiile sale, iar sistemul imun joacă un rol esenţial în patogeneza acesteia, efectele pleiotrope ale statinelor ar putea explica beneficiile clinice rapide obţinute la pacienţii cu boală coronariană aterosclerotică.

b. Utilizare clinică. Indicaţia tratamentului cu statine se face la persoanele cu valori crescute ale LDL-colesterolului (tipurile IIa, IIb şi III de dislipidemie). ***Efectele adverse*** sunt reduse, comparativ cu alte hipolipemiante: cele mai frecvente sunt durerile abdominale, balonări, greaţă. Cele mai importante efecte adverse (din fericire rar întâlnite) sunt citoliza hepatică, rabdomioliza şi cataracta. Transaminazele se evaluează la fiecare 6 săptămâni în primele 18 luni de tratament, iar în caz de mialgii se dozează nivelurile CPK; periodic se recomandă examen oftalmologic; uneori potenţează efectul anticoagulantelor orale, de aceea se recomandă controlul periodic al INR-ului. Se poate administra la persoanele diabetice şi la persoanele cu afecţiuni renale (datorită căii de eliminare biliare, nu se acumulează în plasmă chiar în caz de funcţie renală deteriorată). Asocierea lor cu Ciclosporină trebuie făcută cu precauţie (30% dintre persoanele tratate cu statine şi care au şi tratament imunosupresiv, au prezentat miopatii), administrarea în afecţiuni hepatice şi la femei în perioada graviditătii.

Acidul nicotinic (niacina) şi analogii săi

a. Farmacologie. Este o vitamină hidrosolubilă din grupul B, care influenţează metabolismul LP prin inhibiţia lipolizei în ţesutul adipos şi astfel redu-

ce disponibilizarea de acizi graşi necesari sintezei hepatice atât pentru VLDL cât şi pentru LDL; creşte activitatea lipoprotein-lipazei şi HDL-colesterolul; acidul nicotic este singurul medicament care scade Lp(a). În administrare orală se absoarbe rapid, determinând vasodilatație cutanată prin eliberarea de prostaciclină. Efectul hipolipemiant se instalează de asemenea rapid, constând în scăderea TG, LDL-colesterolului, Lp(a) şi creşterea HDL-colesterolului.

b. Utilizare clinică. Acidul nicotinic este preparatul cu cel mai larg spectru de efecte favorabile asupra metabolismului LP, dar a cărui utilizare este limitată de numeroase efecte adverse. Indicația principală o constituie situațiile cu valori crescute atât ale LDL-colesterolului cât şi ale TG (dislipidemia tip IIb şi III) şi mai ales în cazurile în care se asociază valori scăzute ale HDL-colesterolului. ***Efectele adverse*** cele mai comune sunt: eritem facial, prurit, hiperpigmentare, cefalee, hipotensiune, greață, anorexie; ele sunt prevenite prin creşterea gradată a dozelor, administrare după mese şi asocierea acidului nicotinic cu aspirină (250 mg), care se administrează cu o jumătate de oră înaintea acidului nicotinic. În administrare prelungită creşte acidul uric şi produce alterarea toleranței la glucoză, iar la doze mari este toxic hepatic; glicemia, acidul uric şi enzimele hepatice trebuie urmărite periodic pe parcursul tratamentului. Este ***contraindicat*** în afecțiuni gastrice, hepatice şi în gută. În ultimii ani s-a încercat obținerea unor preparate care să păstreze efectele terapeutice ale acidului nicotinic şi să aibă mai puține efecte adverse: Acipimox, un analog sintetic al acidului nicotinic şi preparatele cu cedare lentă la nivelul tubului digestiv au îmbunătățit aceste aspecte.

Probucolul

a. Farmacologie. Este o substanță liposolubilă cu structură asemănătoarea vitaminei E, exercitând un efect antioxidant şi favorizând captarea hepatică a LDL-colesterolului cu îndepărtarea lui din circulație. Concomitent scade şi nivelul HDL-colesterolului, accelerând însă prin aceasta transportul colesterolului din țesuturi spre ficat, cu reducerea depozitelor periferice de colesterol. Nivelul TG nu este influențat. Se absoarbe din intestin în proporție de 10% din cantitatea administrată şi se transportă în plasmă în structura lipoproteinelor. Timpul de înjumătățire este mai mare de o lună, efectul menținându-se mult timp după întreruperea tratamentului (până la 6 luni).

b. Utilizare clinică. Probucolul este indicat în tratamentul hipercolesterolemiei (mai ales familiale) cu valori normale sau puțin crescute ale TG, dar cu risc oxidativ crescut (fumători, diabetici, persoane care lucrează în mediu toxic). ***Efectele adverse*** sunt rare, incluzând greață, diaree, dureri abdominale, flatulență şi prelungirea intervalului QT pe ECG. Este ***contraindicat*** la persoanele cu HDL-colesterol scăzut, aritmii cardiace şi infarct miocardic recent. Se vor monitoriza periodic - în afara parametrilor lipidici - electroliții (inclusiv magneziul) şi ECG.

Vitaminele antioxidante

În urma studiilor *in vitro* şi *ex vivo*, vitaminele antioxidante au fost considerate, în trecutul apropiat, ca utile în profilaxia oxidării lipoproteinelor, însă studiile clinice recente nu au confirmat un efect antiateroslerotic al acestora.

Uleiul de peşte

a. Farmacologie. Uleiul de peşte marin conține acizi graşi polinesaturați din grupul ω-3 (acid eicosapentanoic/EPA şi acid docosahexanoic/DHA), care reduc sinteza VLDL în ficat şi nivelul chilomicronilor din sânge, scăzând astfel nivelul TG. În afara efectelor asupra metabolismului lipidic, acizii graşi ω-3 şi ω-6 au şi efect antihipertensiv, antiaritmic şi inhibitor al proliferării celulelor musculare netede. Fiind precursori ai prostaglandinelor, EPA şi DHA reduc agregarea plachetară.

b. Utilizare clinică. Indicația uleiului de peşte o constituie situațiile cu valori sever crescute ale TG (prezintă risc crescut de pancreatită acută), care nu răspund în mod adecvat la alt tratament hipolipemiant. ***Efectele adverse*** sunt reduse, putând apare, greață, diaree, creşterea glicemiei, LDL-colesterolului şi timpului de sângerare, în general fără importanță clinică. Sunt ***contraindicați*** în hipercolesterolemie.

Terapia chirurgicală

By-pass-ul ileal parțial (extirparea ultimilor 200 cm ai treimii inferioare a ileonului) modifică semnificativ concentrația lipidelor serice.

Plasmafereza

Acest tip de terapie este indicat la persoanele cu concentrații ale LDL-colesterolului mai mari de 250 mg/dL, în ciuda unei diete adecvate asociată cu tratament hipolipemiant la dozele terapeutice maxime acceptate, la persoanele cu concentrații ale Lp(a) mai mari de 40 mg/dL şi la persoane cu boală aterosclerotică prematură (de obicei persoane cu hipercolesterolemie familială homozigotă).

8.6.3 Conducerea tratamentului

a. Iniţierea tratamentului se face în funcţie de valorile colesterolului şi TG (*Tabelele 8.III, 8.X*). Pentru reducerea efectelor adverse, dozele sunt crescute progresiv. Rezultatele se apreciază prin dozarea colesterolului şi TG după 4-6 săptămâni de tratament.

b. Modificarea tratamentului ales iniţial se face atunci când:

- nu apare un răspuns eficient după 2-3 luni de tratament cu doza maximă admisă sau tolerată,
- apar efecte adverse semnificative în urma tratamentului eficient.

Opţiunile terapeutice în această situaţie sunt schimbarea hipolipemiantului cu un altul, folosit tot ca monoterapie şi/ sau asocierea a două sau chiar trei hipolipemiante.

8.7 Prezentări de caz

8.7.1 Hipercolesterolemie familială

O femeie de 39 ani se prezintă pentru evaluarea riscului cardiovascular într-un centru specializat, ştiind de câţiva ani că are hipercolesterolemie. Este normoponderală (IMC 23 kg/m^2), normotensivă (125/75 mmHg), nu fumează, urmează o dietă hipolipidică (sub 30% din calorii) / hipocolesterolemiantă (mai puţin de 200 mg colesterol/zi) şi face exerciţii fizice regulat, nu foloseşte anticonceptive sau hipolipeminate. Istoricul familial este semnificativ: mama (60 ani) are hipercolesterolemie severă (colesterol: 300 mg/dL) fiind pe tratament cu statine.

La examenul medical nu s-au constatat modificări semnificative la ecografia carotidiană, ale vaselor retinei sau ale electrocardiogramei, pacienta prezenta însă xantomatoză la nivelul articulaţiilor metacarpo – falangiene.

Examinările de laborator au arătat: colesterolul total – 380 mg/dL, trigliceride - 60 mg/dL, HDL-C – 58 mg/dL, LDL-C – 310 mg/dL.

Comentariu:

Antecedentele familiale şi concentraţiile colesterolului total şi LDL, sugerează o hipercolesterolemie familială. Riscul de evenimente cardiovasculare (conform grilelor SCORE) este de 10%. Având în vedere că pacienta urmează deja un regim alimentar şi de viaţă corect (fără să aibă alţi factori de risc), în urma căruia totuşi colesterolemia depăşeşte pragul critic (iar indexul aterogen total este 6,55), trebuie introdus tratamentul cu un agent hipocolesterolemiant, preferabil blocant de HMG-CoA reductază.

8.7.2 Dislipidemie mixtă, secundară

Un bărbat de 48 ani se prezintă la dermatolog cu un rash maculopapular pe abdomen. Este hipertensiv tratat cu atenolol, a câştigat în greutate 8 kg în ultimul an, nu ţine regim alimentar, fumează ocazional şi consumă frecvent alcool. În familia sa există mai multe persoane diabetice şi bunicul a decedat în urma unui accident vascular cerebral hemoragic. La examenul medical bărbatul prezenta tensiunea arterială: 145/95 mmHg, înălţimea: 180 cm, greutatea: 105 kg, obezitate abdominală, ficat palpabil 4 cm sub rebordul costal. Examinările de laborator au arătat: colesterolul total – 280 mg/dL, trigliceride - 360 mg/dL, HDL-C – 38 mg/dL, LDL-C – 170 mg/dL, glicemia – 120 mg/dL, acidul uric – 8,9 mg/dL, GGT- 90 U/L.

Comentariu

Antecedentele personale şi familiale, obezitatea (IMC 32,4 kg/m^2), colesterolul total şi TG, sugerează o dislipidemie mixtă secundară regimului alimentar dezechilibrat, consumului excesiv de alcool. Riscul de evenimente cardiovasculare (conform grilelor SCORE) este de 20-40%, accentuat de sindromul metabolic ale cărui componente sunt uşor de recunoscut între datele clinice şi paraclinice ale pacientului (hipertensiune / obezitate/ toleranţă scăzută la glucoză/ hiperTG/ hipoHDL-C). Având în vedere că pacientul nu urmează un regim alimentar şi de viaţă corect, acesta trebuie introdus imediat, completat cu un tratamentul hipolipemiant, preferabil cu acţiune mixtă (hipo-trigliceridemiant şi hipocolesterolemiant).

8.7.3 Nu neglijaţi niciodată trigliceridele şi HDL-C !

La serviciul de urgenţă se prezintă o persoană de sex masculin în vârstă de 39 ani, cu dureri retrosternale cu caracter anginos, cu debut brusc în urmă cu o oră. Examinările de laborator (cTnI, CK-MB, usCRP), ECG şi coronarografia efectuate în urgenţă au evidenţiat modificări caracteristice pentru infarctul acut de miocard. S-a practicat PTCA de urgenţă cu implantarea unui STENT metalic pe artera coronară descendentă anterioară (stenozată în proporţie de 60% cu accident trombotic în placa de aterom); terapia cu heparine cu greutate moleculară mică, blocanţi de GP IIb/IIIa, beta blocant şi statine, a fost instituită imediat.

Pacientul a fost investigat ulterior pentru parametrii metabolismului lipidic; rezultatele obţinute au fost următoarele:

- Colesterol total – 320 mg/dL
- TG - 250 mg/dL
- HDL-C – 30 mg/dL
- LDL-C - 240 mg/dL

Comentariu

La anamneza mai atentă, pacientul relatează că ştia de hipercolesterolemie (a mai avut rezultate similare la controalele medicale anterioare), dar pentru că şi tatăl său avea valori similare ale colesterolului (colesterol-300 mg/dL, TG-100 mg/dL, HDL-C – 50 mg/dL, LDL-C – 230 mg/dL), fără să prezinte până la vârsta actuală (65 ani) patologie cardiacă, nu a acordat importanţă parametrilor metabolismului lipidic.

Acest caz arată că la concentraţii similare ale colesterolului, asocierea unor valori normale ale TG şi HDL-C (în cazul tatălui) poate proteja împotriva aterosclerozei.

8.7.4 Profilaxie primară la o femeie de vârstă medie, cu multipli factori de risc

Femeie de 42 de ani, fumătoare, normoponderală, fără antecedente personale semnificative, dar cu tatăl decedat la 62 ani cu IMA şi o mătuşă cu AVC la 60 de ani, se prezintă la un control de rutină efectuat de angajator. Greutatea este de 65 kg, la 165cm înălţime (IMC = 23,87 kg/m^2, TA=119/72 mmHg, iar parametrii de laborator:

- Colesterol total – 204 mg/dL
- TG - 160 mg/dL
- HDL-C – 46 mg/dL
- LDL-C - 126 mg/dL

Comentariu

Conform grilelor SCORE, persoana prezintă un risc scăzut. Având în vedere antecedentele familiale, faptul că fumează, iar TG şi HDL-C sunt la limita valorilor recomandate, medicul angajatorului solicită în continuare o determinare de usCRP (marker de microinflamaţie în placa de aterom). Independent de ceilalţi factori de risc cardiovascular, usCRP are valoare predictivă mai bună decât LDL-C pentru riscul de evenimente acute cardiovasculare. La pacienta de faţă, usCRP a avut concentraţia de 4,5 mg/L, ceea ce o poziţionează în categoria pacienţilor cu risc mare de evenimente cardiovasculare, mai mare decât rezultă din concentraţia serică a colesterolului total sau LDL-C.

PRINCE, HPS, REVERSAL, PROVE IT-TIMI 22 şi alte trialuri au dovedit că Statinele scad PCR cu 15-25% în 6 săptămâni de la iniţierea tratamentului. Scăderea în greutate, exerciţiul fizic şi renunţarea la fumat, au de asemenea rol în scăderea PCR.

8.7.5 În diabetul zaharat, dislipidemia este frecventă

Un pacient de sex masculin, în vârstă de 67 de ani, cu diabet zaharat de tip 2 şi hipertensiune medie, este tratat prin dietă şi derivaţi de sulfonil –uree (potenţează efectul eliberator al insulinei din celulele beta pancreatice, de către hiperglicemie), iar hipertensiunea cu inhibitori de enzimă de conversie a angiotensinei. La controlul periodic efectuat la cabinetul de diabetologie, prezintă următoarele rezultate de laborator:

- Glicemia – 120 mg/dL
- HbA1c – 6,1%
- Colesterol total – 270 mg/dL
- TG - 285 mg/dL
- HDL-C – 30 mg/dL
- LDL-C - 183 mg/dL

Comentariu

Diabetul zaharat este considerat echivalent de boală cardiacă aterosclerotică, riscul pe 10 ani de a face o formă clinic manifestă a bolii fiind peste 20%. La acest pacient, deşi diabetul este corect controlat, toţi parametrii lipidici sunt modificaţi. Valoarea scăzută a HDL-colesterolului este frecvent întâlnită la pacienţii cu diabet. Asocierea unui hipolipemiant este obligatorie la acest pacient (derivaţii de acid fibric sunt cei mai indicaţi, în situaţia de faţă).

Bibiografie selectivă

1. Albert M.A., Danielson E., MIA; Rifai N., Ridker P.M.-*PRavastatin Inflammation/ CRP Evaluation trial*; JAMA 2001:286;64-70.
2. Bays H.E., Stein E.A.- *Pharmacotherapy for dyslipidemia: current therapies and future agents*. Expert Opin Pharmacother 2003;4:1901-38.
3. Bays H.E. - *Extended-release niacin/lovastatin: the first combination product for dyslipidemia*. Expert Rev Cardiovasc Ther 2004;2:485-501.
4. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, 189-244.
5. Baynes J.W., Thorpe S.R. – *Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis*, Free Radic Biol Med, 2000, 28: 1708 – 16.
6. Bishop M.L., Fody E.P. – *Reference values for frequently assayed clinical chemistry analytes*. In *Clinical Chemistry: Principles procedures, correlations*, Ed 5, Philadelphia, 2005, Lippincott, Williams & Wilkins.

7. Bosch J, Salim Y., Sheridan P. et al. - *Vitamin E Supplementation Does Not Improve Cardiovascular Events and May Increase the Risk for Heart Failure;* Cardiology Online, March 23, 2005, http://www.cardiologyonline.com/journal_articles/ VitaminE supplementation.htm
8. Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. *Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate–binding cassette protein A1 transporter.* Am J Cardiol 2003;92:10K-16K.
9. Brown M.S., Goldstein J.L – *How LDL Receptors Influence Cholesterol and Atherosclerosis,* Scientific Am, 1985, 251: 52-97.
10. Brown M.S., Goldstein J.L – *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis,* Ann Rev Biochem, 1983, 52: 252-61.
11. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
12. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleşca-Manea Luminița – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică,* Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1998, 15-79.
13. Devlin T.–*Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, 237-358.
14. Durrington P.N. – *How HDL protects against atheroma,* Lancet, 1993, 342: 1315-6.
15. Ernst E., Koenig W. – *Haemoreology, Thrombogenesis and Atherosclerosis,* Semin Thromb Hemost, 1993, 19: 99-103.
16. Evans A. – *The French Paradox: Insights from International Epidemiological Studies,* Lipid Review, 1994, 9: 2-4.
17. Fischbach F. – *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
18. Flavahan N.A. – *Atherosclerosis or Lipoprotein – induced Endothelial Dysfunction,* Circulation, 1992, 85: 1927-37.
19. Furchgott R.F.- *The Discovery of Endothelium - Dependent Relaxation,* Circulation, 1993, 87 (suppl V): 3-8.
20. Goga C., Dobreanu D. – Acizii graşi omega-3, RRML, 2007, 4 (9), 7-16.
21. Gotto A. M., Amarenco P., Assmann G., et al. – *International Lipid Information Bureau – Dyslipidemia and Coronary Heart Disease*, Ed 3, 2003.
22. Hâncu N. - *Factorii de risc cardiovascular – Dislipidemiile*, Ed. Diab Man, 1995.
23. Heart Protection Study Collaborative Group, *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial*, Lancet 2002;360:7-22
24. Hickman T.B, Ronette R.B., Carroll M.D. et al - *Distributions and Trends of Serum Lipid Levels among United States Children and Adolescents Ages 4–19 Years: Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*, Preventive Medicine,1998,Vol 27 (6), 879-90.
25. Hobai Ş., Andras I., Nemes Nagy E., Fazakas Z. – *Biochimie Medicală*, Ed. Veritas Tg.Mureş, 2001.
26. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991, p.173-197.
27. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996, p.22-42.
28. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry,* Ed.5, Mosby, 2004, p.255-278.
29. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine,* Williams & Wilkins, 1994, p.287-301.
30. Nelson D., Cox M. – *Lehninger Principles of Biochemistry,* Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005.
31. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, *et* al, *Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering,* N Engl J Med., 2005;352:29
32. Pagana K., Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 167-173, 513-519.
33. Pleşca-Manea L., Cucuianu M., Crîsnic I. – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică,* 2003.
34. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu-Gheorghiu M. – *Biochimie medicală,* Ed. Medicală, 2000.
35. Ray KK, Morrow D.A. et al. *Intensive statin therapy reduces CRP in acute coronary syndrome patients with metabolic abnormalities and adverse lifestyle features: an analysis from PROVE IT-TIMI 22.* J Am Coll Cardiol 2005;45:247A.
36. Ross R., Glomset J.A. – *The pathogenesis of Atherosclerosis,* New Engl J Med, 1976, 295: 369-377.

37. Scanu A.M. – *Lipoprotein (a) – a Genetic Risk factor for Premature Coronary Hear Disease,* JAMA, 1992, 267: 3326-3329.
38. Shah P.K. – *Inflammation and Plaque Vulnerability,* Cardiovasc Drug Ther, 2009, 23: 31-40.
39. Smith C., Marks A.D., Lieberman M. – *Marks" Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, Ed2, 2005, p.583-686.
40. Stainberg D, Garew T.E, Khoo J.C. – *Beyond Cholesterol, Modification of LDL that increase its atherogenicity,* New Engl J Med, 1989, 320: 915-924.
41. Steiner G., Shafrir E. – *Primary Hyperlipoproteinemias,* McGrawHill Ed, 1991.
42. Waters D.D.- *Stabilization of Coronary Atherosclerosis,* Science Press, 1994.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 9.
Aminoacizii: structură, clasificare, metabolism

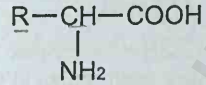
Didona Ungureanu

Introducere

Aminoacizii reprezintă unitățile de bază din structura proteinelor. În urma hidrolizării proteinelor, dozarea aminoacizilor rezultați este utilă atât studiilor fundamentale din laborator cât și pentru investigarea unor defecte enzimatice de pe calea de degradare a scheletului de carbon al aminoacizilor, sindroame care se manifestă, în general, la nou-născuți sau în perioada copilăriei.

9.1 Structură

Aminoacizii sunt molecule care conțin o funcție carboxilică acidă, - COOH și o funcție aminică – NH2. În structura aminoacizilor cele două funcții sunt legate de același atom de carbon, un radical – CH. Structura generală a unui aminoacid este:



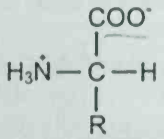
Astfel, fragmentul de moleculă -CH(NH_2)COOH este comun tuturor aminoacizilor din structura proteinelor umane. Cealaltă parte a moleculei de aminoacid, numită și catenă laterală –R, este diferită de la un aminoacid la altul. Pentru cel mai simplu aminoacid, glicocolul (glicina) radicalul R este un atom de hidrogen. Pentru ceilalți aminoacizi, catena laterală are o structură mai complexă (*Tabelul 9.I)*. Catena laterală le conferă proprietăți specifice fiecăruia, împărțindu-i în aminoacizi hidrofobi sau alifatici, aminoacizi dicarboxilici și amidele lor, aminoacizi bazici, aminoacizi cu radical aromatic, aminoacizi cu sulf, aminoacizi cu grupări hidroxil –OH.

9.2 Proprietăți acido-bazice ale aminoacizilor

Grupările carboxil și amino, cât și grupările funcționale ale aminoacizilor imprimă proprietăți acido - bazice peptidelor și proteinelor influențând decisiv structura și implicit și funcția acestor molecule.

La pH fiziologic, între 7,37 și 7,47 gruparea carboxil este disociată iar gruparea amino este protonată, structura unui amino acid putând fi redată astfel:

Acest tip de moleculă ionizată, având atât sarcină positivă cât și negativă, se numește ion bipolar sau amfolit (sau zwitterion).

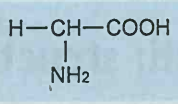
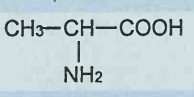
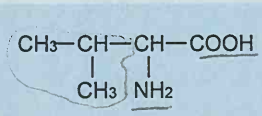
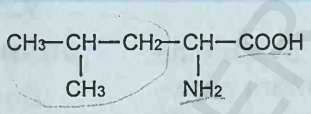
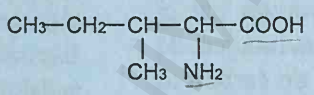
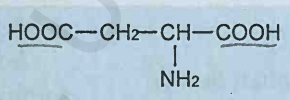
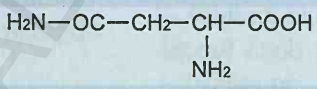
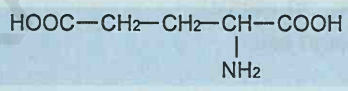
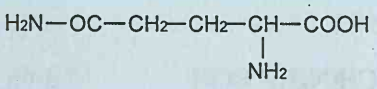
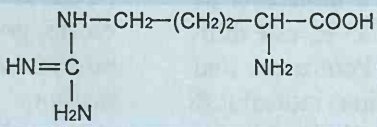
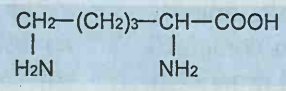
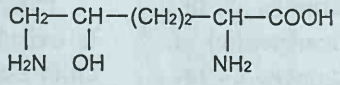
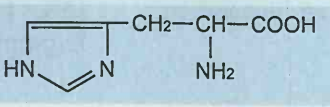


La un pH mic, un aminoacid are structură cationică deoarece ambele grupări sunt protonate (-NH_3 și -COOH). Pe măsură ce pH-ul mediului crește, gruparea carboxil pierde protonul și aminoacidul devine amfolit la un pH egal cu aproximativ 6.

La valori mai mari ale pH-ului gruparea amino este deprotonată și aminoacidul se găsește sub forma unui anion.

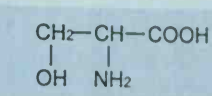
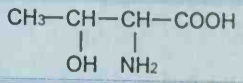
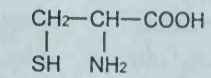
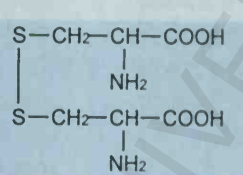
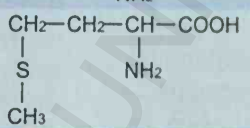
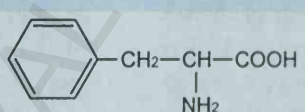
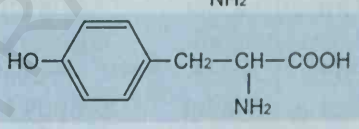
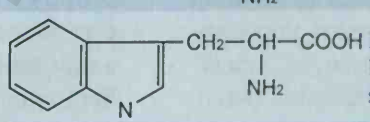
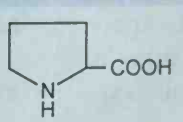
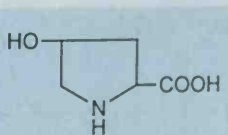
Punctul izoelectric este pH-ul la care molecula există în formă amfolită, adică sarcina moleculei este zero. Poate fi calculat din formula pI = (pK_1+pK_2):2, unde pK_1 și pK_2 reprezintă pK-urile grupării amino respectiv carboxil.

Tabelul 9.I. Structura, caracteristicile şi clasificarea aminoacizilor după natura radicalului

Numele uzual	Numele ştiinţific	Formula structurală R—CH(NH2)—COOH	Comentarii
I. Radical alifatic (acizi monoaminomonocarboxilici)			
Glicina (Glicocol) Gly (G)	Acid aminoacetic		Cel mai simplu aminoacid; optic inactiv; precursor în sinteza purinelor si porfirinelor; *in vitro* este utilizat ca soluţie tampon.
Alanina Ala (A)	Acid amino-propionic		Substrat pentru ALT (TGP); cel mai puţin hidrofobic din grup.
Valina Val (V)	Acid amino-izovalerianic		Aminoacid cu catena laterală ramificată; esenţial; cetogenic; defect genetic in metabolismul său determină „boala urinii cu miros de arţar".
Leucina Leu (L)	Acid α-amino-izocaproic		Aminoacid cu catena laterală ramificată; esenţial; parţial cetogenic; defect genetic in metabolismul său determină „boala urinii cu miros de arţar".
Izoleucina Ile (I)	Acid α-amino-β-metil-valerianic		Aminoacid cu catena laterală ramificată; esenţial; parţial cetogenic; defect genetic in metabolismul său determină „boala urinii cu miros de arţar".
II. Radical cu grupare acidă (acizi monoaminodicarboxilici)			
Acid aspartic Asp (D)	Acid amino-succinic		Substrat al transaminazei glutamicoxalacetice (GOT sau AST); implicat în sinteza pirimidinnelor.
Asparagina Asn (N)	γ-amida acidului amino-succinic		Colector de grupări amino în ţesuturi.
Acid glutamic Glu (E)	Acid α-amino-glutaric		Cosubstrat al transaminazelor (AST şi ALT).
Glutamina Gln (Q)	δ-amida acidului α-amino-glutaric		Colector de amoniac în ţesuturi; donator de grupare amino în sinteza purinelor şi pirimidinelor.
III. Radical cu grupare bazică (acizi diaminomonocarboxilici)			
Arginina Arg (R)	Acid α-amino-δ-guanidino-n-valerianic		Implicat în sinteza ureei; semiesenţial.
Lizina Lys (L)	Acid α,ε-diamino-carpoic		Esenţial.
Hidroxilizina Hyl	Acid α-ε-diamino-δ-hidroxi-n-carpoic		Se obţine prin hidroxilarea posttranslaţională a Lys; se găseşte în colagen în cantităţi apreciable şi de aceea dozarea sa în urină reprezintă un marker al turnoverului osos
Histidina Hys (H)	Acid α-amino-β-imidazolil-propionic		Semiesenţial; gruparea sa imidazol este cel mai important sisitem tampon la pH fiziologic.

BUJ IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 9.1. (continuare)

IV.Radical cu grupare hidroxil (Hidroxiaminoacid)			
Serina Ser (S)	Acid α-amino-β-hidroxi-propionic		Se găseşte în centrul activ al multor enzime; gruparea hidroxi poate suferi procese de fosforilare.
Treonina Thr (T)	Acid α-amino-β-hidroxi-n-butiric		Esenţial.
V. Radical cu grupare tiolică (Tioaminoacizi)			
Cisteina Cys C	Acid α-amino-β-mercapto-propionic		Gruparea funcţională SH- se găseşte în centrul activ al multor enzime; este responsabilă de formarea legăturilor disulfurice din structura proteinelor şi peptidelor; homocisteina are un atom de carbon în plus faţă de Cys şi actual este considerat marker de risc pentru ateroscleroză.
Cistina	Acid β-β-ditio-(α-amino-propionic)		Cistina este dicisteina Cys-S-S-Cys; nu se găseşte liberă în ţesuturi ci numai sub formă de radical cistienil în structura proteinelor.
Metionina Met (M)	Acid α-amino-γ-metil-tio-n-butiric		Esenţial; donator de grupări metil în diferite reacţii ale organismului; donator de sulf altor compuşi.
VI.Radical aromatic (aminoacizi aromatici)			
Fenilalanina Phe (F)	Acid α-amino-β-fenil-propionic		Esenţial; defect al metabolismului său determină fenilcetonuria.
Tirozina Tyr (Y)	Acid α-amino-β-(p-hidroxifenil) propionic		Se poate sintetiza în organism dacă există Phe; intermediar în sinteza catecolaminelor, tiroxinei şi melaninei.
Triptofan Trp (W)	Acid α-amino-β-(3)—indolil-propionic		Esenţial; precursor al serotoninei şi melatoninei; metaboliţii săi sunt crescuţi în sindroame carcinoide.
VII. Iminoacizi			
Prolina Pro (P)	Acid pirolidin-2-carboxilic		Datorită grupării imino destabilizează structurile α şi β secundare. Sub formă hidroxilată se găseşte în structurile multor proteine ale ţesutului conjunctiv.
Hidroxiprolina Hyp	Acid 4-hidroxi-pirolidin-2-carboxilic		Sinteza sa din Pro se realizează posttranslaţional; alături de hidroxi-Lys reprezintă marker al turnoverului osos deoarece reprezintă aproximativ 30% din structura colagenului.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 9.II. Valorile pK-urilor grupărilor ionizabile din aminoacizi

Gruparea ionizabilă	pK
Gruparea carboxil principală -COOH = pK_1	1,7 – 2,6
Gruparea α-amino NH_3^+ = pK_2	9 – 10,8
Gruparea carboxil secundară din R (de la Glu şi Asp)	3,8 – 4,3
Gruparea imidazol a His	6
Gruparea sulfhidril a Cys -SH	8,3
Gruparea fenol a Tyr	10,1
Gruparea ε- amino a Lys -OH	10,5
Gruparea guanidinium a Arg	12,5

Glicina, având pK_1=2,34 şi pK_2=9,60, exemplifică comportamentul acidobazic al aminoacizilor care nu conţin grupări ionizabile în radicalul R.

Din cei 20 de aminoacizi, 7 conţin grupări ionizabile care influenţează sarcina aminoacizilor, iar la nivelul proteinelor determină legături cu alţi radicali R, imprimând moleculei proteice o anumită structură spaţială şi în consecinţă o anumită funcţie.

Influenţa radicalilor R

Radicalul R al aminoacizilor este responsabil de proprietăţi speciale. În *Tabelul 9.I,* aminoacizii au fost clasificaţi în funcţie de gruparea R; astfel, unii aminoacizi au grupări R nepolare şi de aceea au caracter hidrofob. Alţii au grupări R polare, hidrofile dar neutre din punct de vedere electric. Alţi aminoacizi au grupări polare, încărcate electric, negativ sau pozitiv. Grupările R pot fi liniare ca valina sau ciclice ca de exemplu prolina, mici (glicina) sau mari (triptofanul). Această diversitate a grupărilor radicalice permite un număr mare de interacţiuni ceea ce are importanţă în determinarea structurii proteice. În *Tabelul 9.II* sunt redate valorile pK ale grupărilor amino, carboxil cât şi ale radicalilor R.

De exemplu, la pH fiziologic acidul glutamic şi acidul aspartic au cea de-a doua grupare carboxil ionizată, astfel încât au sarcini negative la pH≈7. Cu excepţia histidinei, majoritatea aminoacizilor bazici sunt încărcaţi pozitiv la pH fiziologic. Aceste sarcini ale aminoacizilor permit, la nivel proteic, dezvoltarea de legături electrostatice atât în interiorul moleculei proteice cât şi între proteină şi ligant. Proprietăţile acidobazice şi solubilitatea diferită stau la baza separării electroforetice sau cromatografice a aminoacizilor.

Datorită structurilor radicalilor R, aminoacizii pot fi identificaţi prin diferite reacţii biochimice.

9.3 Peptidele

Aminoacizii au proprietatea de a se „lega" unul de altul – o grupare carboxil a unui aminoacid reacţionând cu o grupare amino a altui aminoacid cu formarea unei legături de tip amidic -CO-HN- cunoscută sub denumirea de legătură peptidică (*Figura 9.1).*

Un dipeptid poate interacţiona cu un nou aminoacid rezultând un tripeptid.

Primul aminoacid care participă la legătura peptidică are gruparea amino liberă şi de aceea este denumit aminoacid N-terminal. Al doilea aminoacid care participă are gruparea carboxil liberă şi de aceea se numeşte aminoacid C-terminal. Capete N- şi C- terminale au şi peptidele şi proteinele, prin convenţie aminoacidul N- terminal fiind considerat primul aminoacid.

Peptidele pot avea lanţuri scurte de doi, trei, patru aminoacizi fiind denumite di- tri- tetrapeptide.

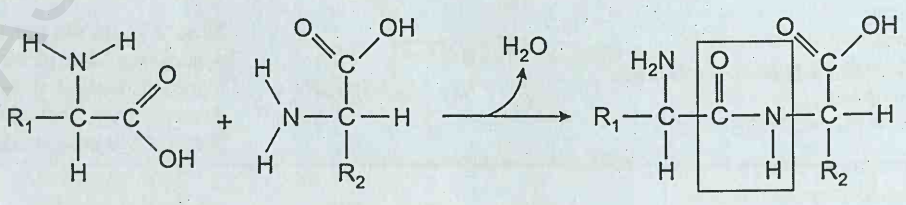
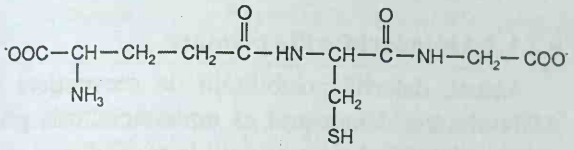


Figura 9.1. Formarea legăturii peptidice

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

De exemplu, glutationul este un tripeptid format din acid glutamic, cisteină şi glicocol, care se găseşte în toate celulele organismului.



γ-Glutamil-Cisteinil-Glicină
Glutation (GSH)

De remarcat că în glutation acidul glutamic participă la formarea primei legături peptidice prin gruparea γ-carboxil şi de aceea structura glutationului este γ-Glu-Cys-Gly. Gruparea funcţională a glutationului este gruparea sulfhidril şi de aceea acronimul său este GSH. În organism poate exista în două forme- redusă (GSH) sau oxidată (GSSG) îndeplinind un important rol fiziologic, fiind socotit un important sistem oxido-reducător celular.

Lanţurile peptidice cu până la cinci aminoacizi se numesc oligopeptide, iar cele care conţin între 6 şi 30 aminoacizi se numesc polipeptide. Lanţurile cu mai mult de 40 de aminoacizi se numesc proteine. Această împărţire este arbitrară deoarece structurile peptidelor şi proteinelor sunt asemănătoare, fiind formate din aminoacizi.

Peptidele joacă roluri majore în funcţia celulelor şi implicit a organismului; de exemplu mulţi hormoni sunt de natură peptidică. De asemenea, factorii de transcripţie sunt peptide cu rol în „dirijarea" expresiei genelor.

9.4 Metabolismul aminoacizilor

La subiecţii sănătoşi principala sursă de aminoacizi a organismului o reprezintă proteinele din alimente. Acestea suferă sub acţiunea enzimelor digestive (proteaze), un proces de hidroliză în urma căruia rezultă aminoacizii care apoi sunt absorbiţi şi prin vena portă ajung în ficat. Ficatul utilizează aminoacizii pentru sinteza proteinelor proprii cât şi a multor altor proteine funcţionale, care o dată sintetizate, trec în torentul circulator. Totuşi, o parte din aminoacizii ajunşi sau sintetizaţi în ficat – părăsesc acest organ şi trec în circulaţia sanguină, constituind „pool-ul endogen" al aminoacizilor. Din sânge, aminoacizii sunt extraşi de diferite ţesuturi pentru sinteza proteinelor proprii. Dintre ţesuturi, ficatul şi rinichiul au un rol esenţial în metabolismul aminoacizilor. În aceste organe au loc reacţii de transaminare şi dezaminare oxidativă, în urma cărora rezultă amoniac, compus toxic organismului. Amoniacul, la nivel hepatic este convertit în uree, iar la nivel renal este eliminat sub formă de ion amoniu NH_4^+ participând astfel la îndepărtarea protonilor - H^+ - din organism (*Figura 9.2).*

Aminoacizii din sânge sunt filtraţi la nivelul glomerulului renal, dar la nivelul tubilor suferă un proces de reabsorbţie activă, prin intermediul unor sisteme de transport saturabile. Astfel aminoacidemia crescută se însoţeşte de o creştere semnificativă a excreţiei renale (aminoacidurie). La subiecţii normali, aminoaciduria este tranzitorie şi se datorează unui aport alimentar excesiv în aminoacizi.

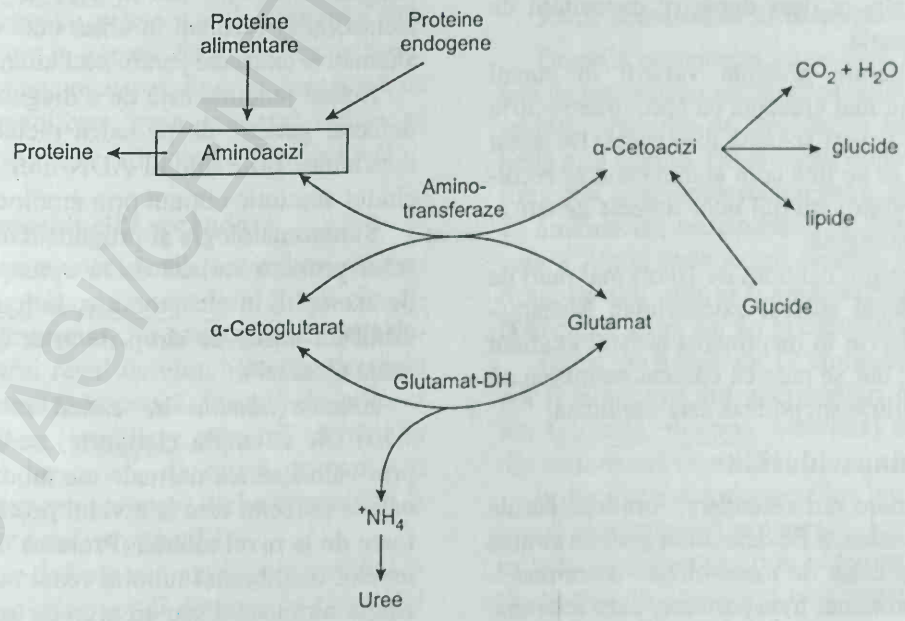


Figura 9.2. Schema generală a metabolismului aminoacizilor

Reabsorbția renală este un proces activ, dependent de un sistem de patru proteine membranare transportoare cât și de concentrația intracelulară de Na^+. Sistemele membranare transportoare sunt: unul pentru aminoacizii neutri, altul pentru aminoacizii bazici, al treilea pentru prolină, hidroxiprolină și glicină și unul pentru aminoacizii dicarboxilici. Se pare că pentru unii dintre aminoacizi transportul transmembranar se realizează prin două mecanisme: unul de capacitate mică dar cu specificitate înaltă și un altul cu capacitate mare dar specificitate joasă. Puțini aminoacizi, ca de exemplu cistationina și homocisteina nu pot fi reabsorbiți eficient la nivel renal și de aceea suferă doar un proces de filtrare fiind ulterior eliminați în urina finală.

Se cunosc trei cauze ale aminoaciduriei:

- aminoaciduria datorată creșterii aminoacidemiei cu depășirea pragului renal;
- aminoaciduria renală – nivelul plasmatic al aminoacizilor este normal dar există un defect congenital sau dobândit la nivelul transportorului transmembranar;
- aminoaciduria „fără prag" de eliminare renală – în care se elimină renal, în cantități mari, un aminoacid sau un metabolit al acestuia datorită unui defect genetic pe calea de metabolizare a acelui aminoacid, valoarea plasmatică a aminoacidului rămânând la valori normale;

De remarcat că homocistinuria, deși este o aminoacidurie „fără prag", nu se datorează vreunui defect primar (genetic) sau secundar unei afecțiuni renale, ci doar depășirii capacității de reabsorbție renală.

Aminoacidemia prezintă variații în cursul unei zile, fiind mai crescută cu aproximativ 30% după amiaza și mai scăzută dimineața. De acest lucru trebuie să se țină cont atunci când se recoltează sânge pentru studiul unor defecte genetice, mai ales heterozigote.

Celulele conțin cantități de 10 ori mai mari de aminoacizi decât spațiul extracelular. Mecanismele care intervin în menținerea acestui gradient nu se cunosc, dar se pare că enzima membranară gama-glutamiltranspeptidaza este implicată.

9.4.1 Aminoaciduriile

Pot fi primare sau secundare. Aminoaciduriile primare se datorează fie defectului genetic al unei enzime de pe calea de metabolizare a aminoacidului sau a proteinei transportoare, care intervine în reabsorbția renală. Aminoaciduriile secundare apar datorită fie afectării unui organ implicat în metabolismul aminoacizilor, ca de exemplu ficatul sau rinichiul, fie unei malnutriții grave.

9.4.1.1 Aminoaciduriile primare

Actual, datorită posibilității de secvențiere a ADN-ului s-a demonstrat că aminoaciduriile primare se datorează unor mutații la nivelul unei enzime implicate în metabolismul unui aminoacid. Această enzimă determină o diminuare până la zero a activității enzimatice, care se manifestă fie prin acumularea în exces a substratului enzimei, care fiind toxic pentru organism, va determina o anumită simptomatologie, fie substratul enzimei defective este metabolizat de organism pe alte căi secundare, producându-se în exces metaboliți toxici, care în mod normal, au valori plasmatice și urinare foarte scăzute. Foarte rar defectul enzimatic se întâlnește pe calea de sinteză a unui compus util organismului (de exemplu, defectul în sinteza melaninei determină albinism). În unele cazuri nu se acumulază în sânge substratul enzimei defective deoarece la nivel renal acel metabolit nu este reabsorbit (aminoaciduriile fără prag renal de eliminare) – în aceste situații valorile sanguine ale substratului enzimei defective sunt scăzute, pe când valorile urinare sunt crescute.

Astfel diagnosticul unui defect enzimatic poate fi făcut la trei niveluri: 1. studiul ADN-ului pentru evidențierea mutației genetice; 2. studiul activității enzimei presupusă a fi defectivă; 3. dozarea metaboliților în amonte sau în aval de enzimă, sau a metaboliților rezultați în urma unei căi secundare, alternative existente pentru acel aminoacid.

Actual tendința este de a diagnostica prenatal defectul genetic de pe calea metabolică a aminoacidului prin studiul ADN-ului extras din lichidul amniotic obținut prin amniocenteză.

Simptomatologia și prognosticul aminoaciduriilor primare variază de la aproape benign, ca, de exemplu, în alcaptonurie, la letal ca în boala urinii cu miros de sirop de arțar („maple syrup urine disease").

Aminoaciduriile de cauză renală (*Tabelul 9.III*) (de exemplu cistinuria) se caracterizează prin valori serice normale ale aminoacidului deoarece defectul este la nivelul proteinei transportoare de la nivel tubular. Proteina defectivă de la nivelul membranei tubului renal poate afecta un singur aminoacid sau un grup de aminoacizi care utilizează același sistem de reabsorbție tubulară.

Tabelul 9.III. Aminoacidurii primare de cauză renală

Boala	Prevalența	Aminoacidul prezent în exces în urină	Semne clinice	Tratament
Cistinuria - forma clasică	1: 13000	Lizina, ornitina, arginina, cistina	Calculi renali de cistină	Ingestie crescută de lichide, alcalinizarea urinii, D-penicilamina, captopril
Hipercistinuria	Rară	Cistina	Calculi renali de cistină	Ingestie crescută de lichide, alcalinizarea urinii, D-penicilamina, captopril
Aminoaciduria dibazică și intoleranța la proteine cu lizina	Rară	Lizina, ornitina, arginina	Stări de vomă, hepatomegalie, talie mică pentru vârstă, intoleranță la proteine, retard mintal	Dietă cu cantități scăzute de proteine
Boala Hartnup	1:18000	Toți aminoacizii neutri	Poate fi asimptomatică, frecvent pacientul prezintă sindrom pelagră-like: dermatită, simptome neurologice și psihiatrice	Aport adecvat de proteine, nicotinamida
Iminoglicinuria	1:12000	Glicina, prolina, hidroxiprolină	Benignă	
Aminoaciduria dicarboxilică	Rară	Acid glutamic, acid aspartic	Probabil benignă	
Reabsorbție defectuoasă a metioninei	Rară	Metionina, dar și tirozina, fenilalanina, aminoacizii ramificați, acid α-hidroxibutiric	Depigmentarea părului, atac cerebral, retard mental	Dietă cu cantități scăzute de metionină

Aminoaciduriile primare prin depășirea pragului renal, sunt în general boli genetice cu transmitere autosomal recesivă, ceea ce înseamnă că pentru a se manifesta, gena defectivă trebuie să fie prezentă pe ambii cromozomi (*Tabelul 9.IV*).

9.4.1.2 Aminoaciduriile secundare

În general aminoaciduriile secundare afectează mai mulți aminoacizi simultan. Pot fi clasificate, ca și cele primare, în aminoacidurii prin depășirea pragului renal de eliminare (de exemplu în hepatita acută fulminantă, însoțită de necroza ficatului), cât și secundare afectării rinichiului (afectarea tubilor renali, de cauză primară sau secundară, ceea ce determină disfuncționalități la nivelul tubilor renali proximali).

Principalele defecte enzimatice ale metabolismului aminoacizilor vor fi descrise în *Capitolul 9.4.3.2.*

9.4.2 Biosinteza aminoacizilor

Digestia proteinelor nu asigură întreaga cantitate de aminoacizi necesară organismului. În consecință, proporția de aminoacizi trebuie reechilibrată prin sinteză. Organismul uman nu poate realiza acest lucru deoarece nu poate sintetiza toți cei 20 aminoacizi, nedispunând de unele enzime necesare. Astfel aminoacizii esențiali nu pot fi sintetizați, iar alții, cum ar fi arginina poate fi sintetizată în ciclul ureei, dar nu în cantități suficiente.

Totuși, un număr de 12 aminoacizi neesențiali pot fi sintetizați din intermediari metabolici, iar trei (cisteina, tirozina, histidina) se sintetizează din aminoacizi esențiali.

În biosinteza aminoacizilor, un rol central îl ocupă glutamat-dehidrogenaza, glutamin-sintetaza și transaminazele; prin acțiunea lor combinată, amoniacul anorganic este transformat în grupare amino din aminoacizi.

Tabelul 9.IV. Aminoacidurii primare prin depăşirea pragului renal

Boala	Prevalenţa	Enzima deficientă	Aminoacidul/ metabolitul în exces în sânge	Aminoacidul/ metabolitul în exces în urină	Semne clinice	Tratament
Hiperfenilalaninemia (forma clasică de fenilcetonurie) varianta I	1:10000	Fenilalanin hidroxilaza (absentă)	fenilalanina	Fenilalanina şi metaboliţii săi (fenilpiruvat, fenillactat, o-hidroxifenillacta)	Retard mintal,eczeme	Dietă fără fenilalanină
Varianta II	1:14000	Fenilalanin hidroxilaza (deficientă)	fenilalanina	variabil	Retard mintal moderat	Dietă fără fenilalanină
Fenilcetonuria tranzitorie, neonatală (Varianta III)	1:30000	Fenilalanin hidroxilaza (deficientă)	fenilalanina	Metaboliţii fenilalaninei în general nu se întâlnesc în urină	normal	Nu este necesar
Varianta IV	Rară	Dihidropterin reductaza	fenilalanina	variabil	Semne neurologice	DOPA, 5-OH-triptofan
Varianta V	1:30000	Defect în sinteza biopterinei	fenilalanina	variabil	Semne neurologice	DOPA, 5-OH-tirptofan
Tirozinemia Tipul I (tirozinoza)	1:100000	Fumaril acetocetat hidrolaza (absentă)	tirozina, metionina	Tirozina şi metaboliţii săi, DOPA, aminoaciduria generalizată (sdr. Fanconi)	Ciroză hepatică, afectare renală	Dietă fără fenilalanină, tirozină, metionină (dieta nu influenţează evoluţia spre ciroză)
Tipul II	Rară	Tirozin aminotransferaza (absentă)	tirozina	Tirozina şi metaboliţii săi, tiramina	Retard mintal, leziuni cutanate, oculare	Dietă fără fenilalanină, tirozină
Forma tranzitorie, neonatală (tipul III)	Nou născuţi la termen 1:10, prematuri 1:3	Imaturitatea ficatului	tirozină, fenilalanină	Tirozina şi metaboliţii săi, tiramina	Nu se manifestă clinic	Vitamina C; dietă cu reducerea cantităţii de proteine ingerate
Alcaptonuria	1:250000	Homogentizin oxigenază (absentă)	acid homogentizin (creştere moderată)	Acid homogentizinic	Artrită degenerativă, pigmentarea cartilagiilor	Nu răspunde la nici un tratament
Homocistinuria	1:200000	Cistationin β-sintetaza	homocisteina, metionina (moderat)	Homocisteina, metionina şi sufoxidul său	Atingeri oculare, vasculare, osoase	Piridoxina, dietă fără metionină, imbogaţită cu cisteina
	Rară	Metilentetrahidrofolic reductază (absentă sau deficientă)	homocisteina, cu valori normale ale metioninei	Homocisteina, cu valori normale ale metioninei	Retard mintal	Acid folic
	Rară	Metiltransferaza	homocisteina, cu valori normale ale metioninei	Homocisteina şi acid metilmalonic	Retard mintal	Vitamina B_{12}

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Tabelul 9.IV. (continuare)

Histidinemia	1:20000	Histidaza (absentă)	Hisidină, alanină	Imidazol, acid piruvic şi alţi metaboliţi ai săi	Variabil, de la normal alteori simtomatologie neurologică ca de exemplu retard mintal sau defecte în vorbire	
Boala urinii cu miros de arţar	1:250000	Decarboxilaza specifică aminoacizilor ramificaţi este defectivă	În timpul atacurilor acute: leucina, izoleucina, aloizoleucina, valina şi aminoacizii corespunzători	În timpul atacurilor acute: la fel ca în sânge	Acidoză care poate fi letală, însoţită de greţuri şi alte simptome neurologice; alteori se manifestă ca retard mintal	Dietă fără leucină, izoleucină, valină
Hiperglicinemia noncetoacidozică	1:1500000	Defect la nivelul enzimei de scindare a glicinei	glicina	Glicina (şi în LCR)	Semne neurologice, hipotonie şi absenţa cetoacidozei şi, în formele severe – retard mintal cu supravieţuire până la 2ani	Fără rezultat
Acidemia propionică	rară	Propionil CoA carboxilază (deficientă)	glicina	Glicina, propionatul, hidroxipropionat, metilcitrat	Cetoacidoza metabolică cu un grad variabil de retard mintal	Dietă cu aport proteic scăzut
Acidemia metilmalonică	1:20000	Metilmalonil CoA mutaza (absentă sau deficientă)	Glicina, acidul metimalonic	Glicina, acidul metimalonic (şi în LCR), cetonurie	Cetoacidoza metabolică cu un grad variabil de retard mintal	Vitamina B_{12}
Cistationuria	1:70000	γ-cistationaza (absentă sau deficientă)	cistationa	Cistationa (şi în LCR) şi metaboliţii săi	benignă	Nu e necesar
Carnozinemia	1:500000	Carnosinaza (deficientă)	carnozina	Carnozina şi homocarnozina (şi în LCR)	Sindroame neurologice grave	Fără rezultat
Hiperprolinemia tipul I	0	prolin oxidaza (deficientă)	prolina	Prolina, hidroxiprolina, glicina	benignă	Nu e necesar
Hiperprolinemia II	1:30000	D-pirolin-5- acid carboxilic-dehidrogenază (deficientă)		Prolina, hidroxiprolina, glicina	benignă	Nu e necesar

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

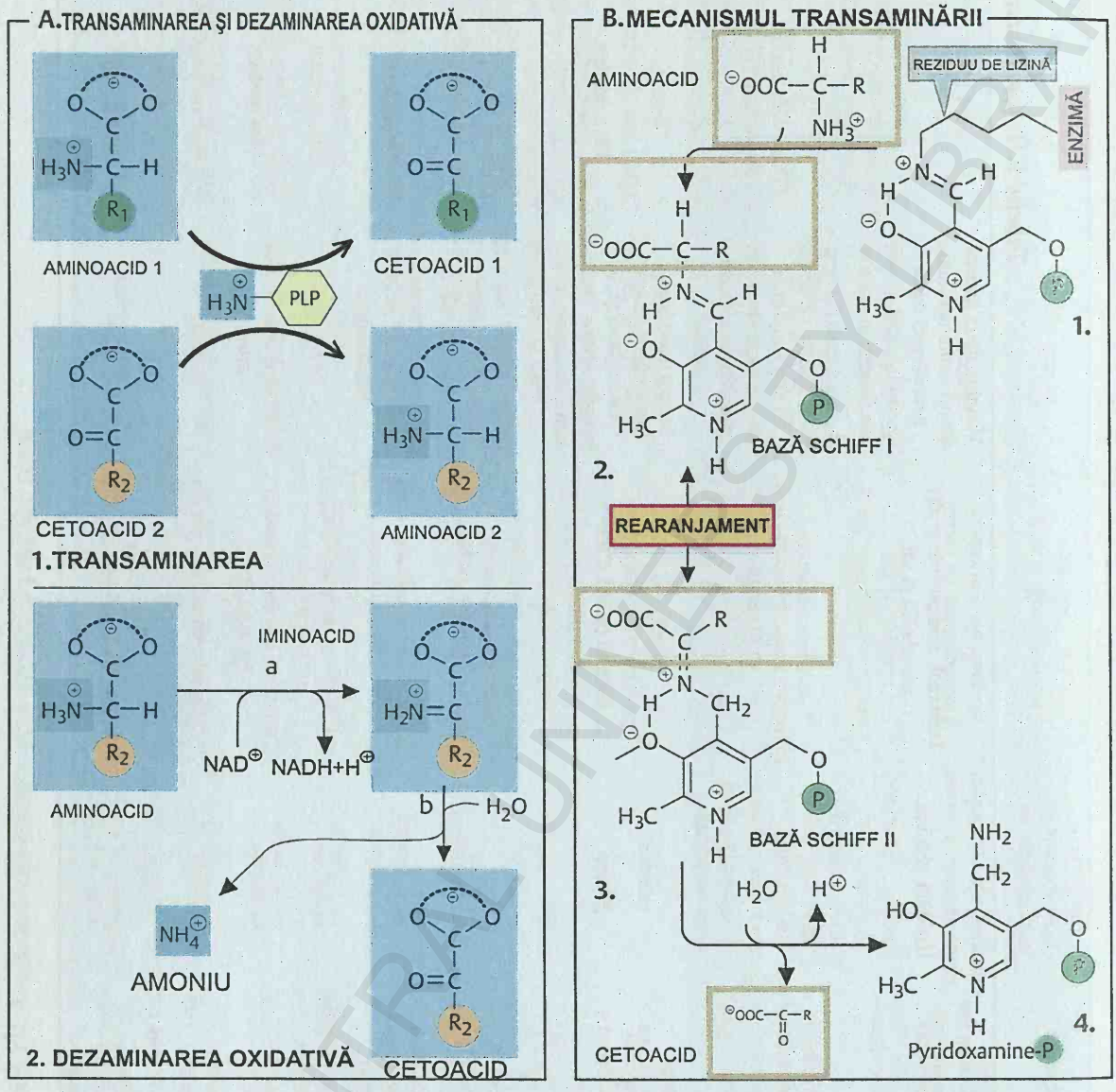


Figura 9.3. Transaminarea si dezaminarea oxidativă. Mecanismul transaminării

9.4.3 Catabolismul aminoacizilor

Spre deosebire de acizi graşi şi glucoză, aminoacizii nu pot fi stocaţi în organism. Surplusul de aminoacizi care depăşeşte necesarul pentru sinteza de proteine şi alte biomolecule, este supus degradării.

9.4.3.1 Catabolismul grupării amino

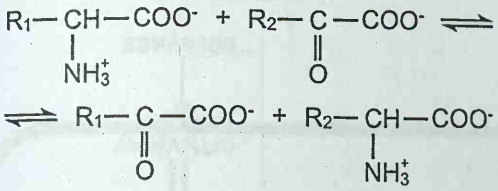
Animalele superioare, printre care şi omul, excretă azotul proteic sub formă de uree, compus solubil în apă şi netoxic. Prin catabolizarea aminoacizilor, gruparea α-amino eliberată sub formă de ion NH_4^+, este convertită la uree, iar scheletul de C rămas este transformat în acetil CoA, piruvat sau alt intermediar din ciclul acizilor tricarboxilici. Aceşti din urmă compuşi sunt utilizaţi drept sursă de energie şi pentru sinteza de acizi graşi, corpi cetonici şi glucoză.

Îndepărtarea grupării α-amino se realizează prin două procese:

- transaminarea, în care grupările amino ale majorităţii aminoacizilor sunt colectate sub formă de glutamat;
- dezaminarea oxidativă a glutamatului, prin care se eliberează NH_4, convertit ulterior în uree.

Transaminarea şi dezaminarea oxidativă

Transaminarea, ca definiţie, este reacţia de transfer a unei grupări amino de pe un aminoacid pe un cetoacid, cu formarea unui nou aminoacid şi a unui nou cetoacid.



Este o reacție reversibilă, catalizată de aminotransferaze sau transaminaze (*Figura 9.3*). Coenzima transaminazelor este vitamina B_6, care este legată la un rest de lizină al enzimei și care în cursul reacției trece reversibil din forma sa de piridoxalfosfat în formă de piridoxaminfosfat. Cu excepția prolinei, lizinei și treoninei, toți ceilalți aminoacizii suferă reacții de transaminare în cursul metabolismului lor.

În organismul uman, în urma reacției de transaminare, gruparea amino a aminoacizilor este colectată de doi cetoacizi - acidul piruvic și acidul α-cetoglutaric sub acțiunea a două transaminaze – alanintrasaminaza (ALT) și aspartat transaminaza (AST). Reacția generală este redată în *Figura 9.4.*

Se observă că acidul glutamic reprezintă colectorul grupărilor amino din organism prin intermediul cetoacidului său – α-cetoglutarat. La nivel hepatic, acidul glutamic suferă reacția de dezaminare oxidativă în urma căreia se reface α-cetoglutaratul, iar gruparea amino este eliberată sub formă de amoniac sau ion amoniu. Această reacție este catalizată de glutamat dehidrogenază care poate funcționa fie cu NAD^+, fie cu $NADP^+$(*Figura 9.5*).

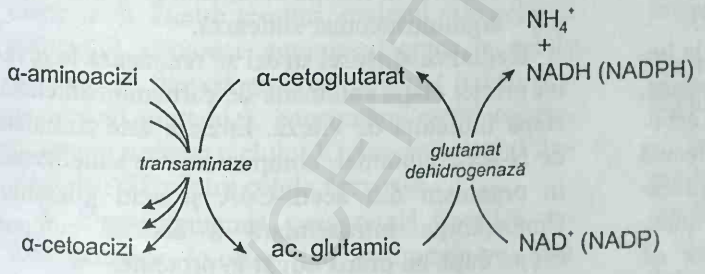
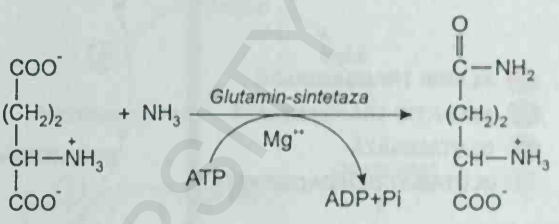


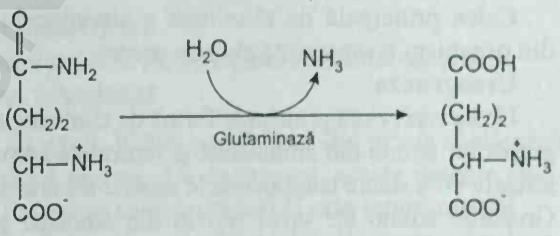
Figura 9.5. Acțiunea combinată a transaminazelor și glutamat dehidrogenazei

Metabolismul amoniacului

În organism cantitatea cea mai mare de amoniac rezultă la nivelul intestinului gros, unde enzimele secretate de bacteriile ce colonizează colonul, acționează asupra aminoacizilor nereabsorbiți până la acel nivel producând amoniac. O altă sursă de amoniac o reprezintă reacțiile de transaminare cuplate cu reacția de dezaminare oxidativă a acidului glutamic. Amoniacul este un compus toxic și trebuie rapid neutralizat.



Amoniacul rezultat în tubul digestiv, prin vena portă este transportat în ficat, unde este convertit la uree. În schimb, în celelalte țesuturi, amoniacul rezultat este fixat pe acidul glutamic, cu formarea amidei acidului glutamic – glutamina.



Enzima care catalizează această reacție este glutamin sintetaza – enzimă ATP-dependentă. Glutamina, este un aminoacid și odată formată, părăsește celula și pe cale sanguină ajunge în ficat sau rinichi, unde sub acțiunea unei hidrolaze – glutaminaza, eliberează amoniacul și acidul glutamic. În ficat amoniacul intră în ciclul ureei iar la nivel renal, NH_3 este convertit la ion amoniu - NH_4^+, care se elimină renal, intervenind astfel în menținerea echilibrului acido-bazic al organismului.

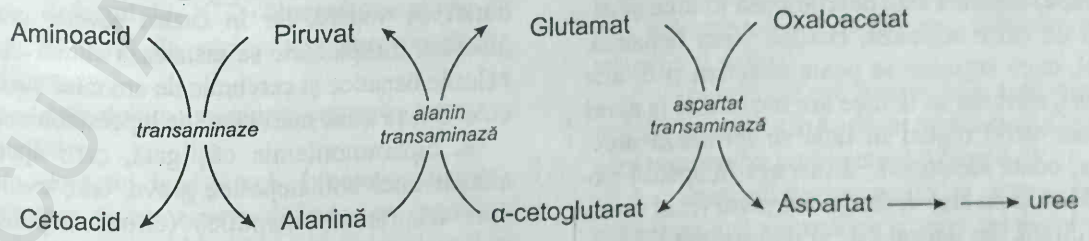


Figura 9.4. Transferul grupării amino de la aminoacizi spre ciclul ureei

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

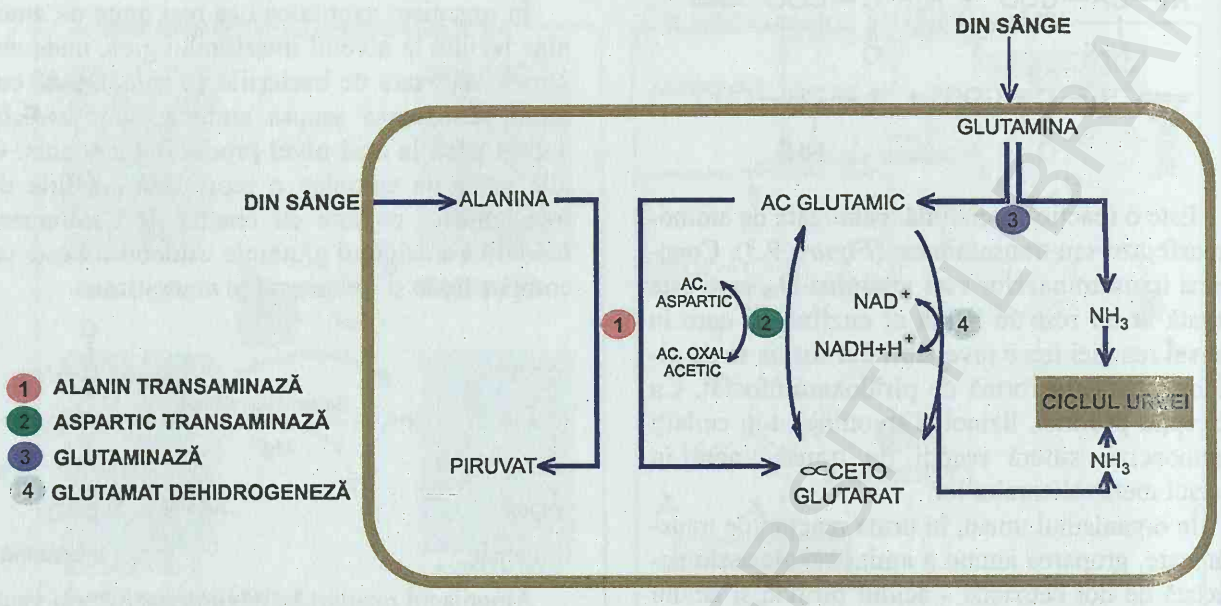


Figura 9.6. Metabolismul amoniacului

Schematic, metabolismul amoniacului este redat în *Figura 9.6.*

Calea principală de eliminare a amoniacului din organism o reprezintă sinteza ureei.

Ureogeneza

Ureea reprezintă principala formă de eliminare a grupărilor amino din aminoacizi şi reprezintă aproximativ 90% dintre componentele azotate ale urinei. Grupările amino ale ureei provin din amoniac şi acid aspartic şi sub acţiunea a cinci enzime sunt convertite în uree. Reacţiile au loc numai în hepatocite, în citoplasmă sau mitocondrie (*Figura 9.7).*

Primele două reacţii au loc în mitocondria hepatică unde există şi glutamat dehidrogenaza, donatorul primei grupări amino a ureei. Carbonul din structura ureei provine dintr-o moleculă de bioxid de carbon. Citrulina rezultată, difuzează din mitocondrie în citoplasmă, unde condensează cu acidul aspartic (al doilea donator de grupare amino din structura ureei) cu formarea argininosuccinatului. Acest compus este ulterior descompus în arginină şi acid fumaric, iar în ultima etapă, arginina este descompusă în uree şi ornitină de către arginază, enzimă strict hepatică. Astfel, dacă arginina se poate sintetiza şi în alte ţesuturi, clivarea sa la uree are loc numai la nivel hepatic, astfel numai în ficat se formează uree. Ureea, odată sintetizată, difuzează în spaţiul extracelular şi de aici în sânge. La nivel renal ureea este filtrată, dar parţial este şi reabsorbită.

Acidul fumaric rezultat din ciclul ureei este utilizat în alte reacţii metabolice: în urma hidratării la malat, acesta traversează membrana mitocondrială şi ajuns în matrice, intră în ciclul Krebs, transformându-se în acid oxalacetic şi prin transaminare se obţine acid aspartic (*Figura 9.7*).

Din punct de vedere energetic, în sinteza ureei se consumă 4 molecule de ATP: două sunt necesare pentru prima reacţie, iar celelalte două sunt consumate pentru refacerea ATP- ului din AMP rezultat în reacţia catalizată de a treia enzimă – argininosuccinat sintetază.

Reglarea sintezei ureei se realizează la nivelul primei etape catalizată de carbamoilsintetază, etapa limitantă de viteză. Enzima este stimulată de N-acetilglutamat, compus care se sintetizează în organism din acetil-CoA şi acid glutamic. Concentraţia intracelulară a acestui compus creşte după un prânz bogat în proteine.

Hiperamoniemia se caracterizează prin creşterea amoniacului în sânge şi se manifestă prin tremurături ale membrelor, dificultăţi în vorbire, tulburări de vedere, iar în cazuri severe, coma şi moartea. Simptomele se instalează atunci când nivelurile hepatice şi cerebrale de amoniac sunt crescute. Există două mari clase de hiperamoniemii:

a. hiperamoniemia câştigată, care apare secundar unei boli hepatice grave, care evoluează spre insuficienţă hepatică (ciroza hepatică de cauză virală, toxică, sau obstrucţia biliară). Dato-

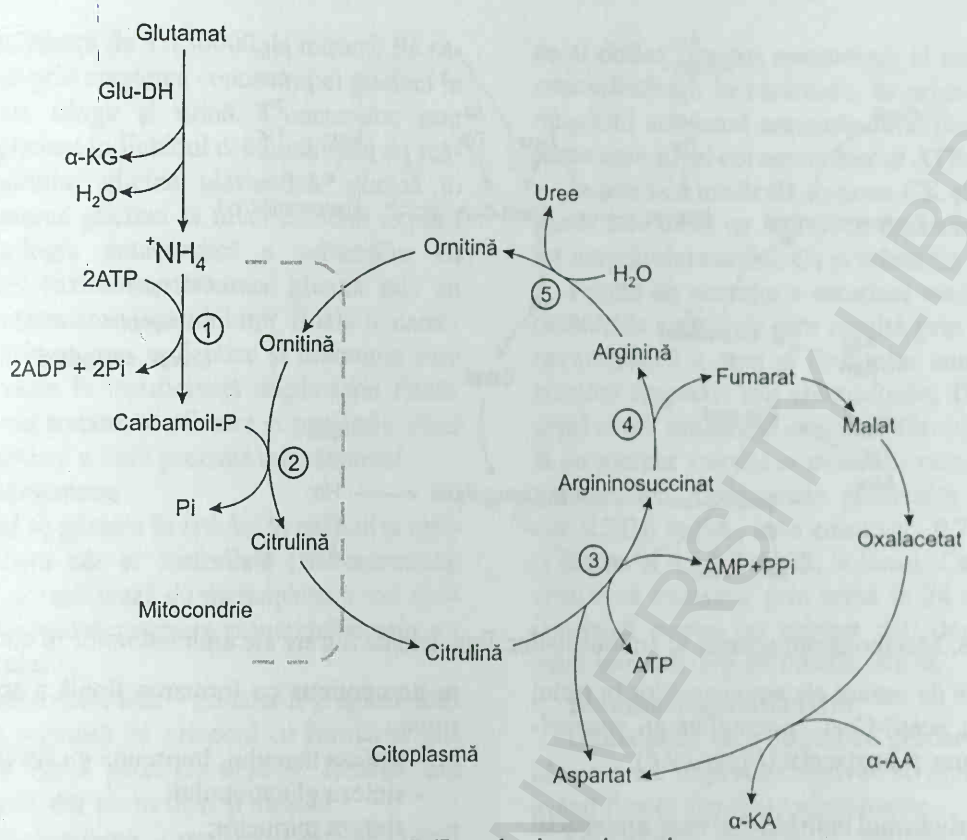


Figura 9.7. Etapele sintezei ureei.
1.Carbamil-fosfat-sintetază; 2.Ornitil carbamil transferaza (OCT); 3.Argininosuccinat-sintetaza; 4. Argininosuccinaza; 5.Arginaza

rită circulației colaterale care se dezvoltă, în timp, ficatul este șuntat, iar sângele portal se varsă direct în circulația sanguină. Astfel, amoniacul absorbit din tubul digestiv nu mai este convertit la uree, valoarea sa sanguină crescând foarte mult. Dintre țesuturi, creierul este cel mai vulnerabil, deoarece amoniacul ajuns în celula nervoasă se fixează pe α-cetoglutarat (cu formare de acid glutamic), consumând astfel α-cetoglutaratul necesar ciclului Krebs- principalul furnizor de ATP pentru celula nervoasă.

b. hiperamoniemia congenitală, implică defecte genetice ale celor cinci enzime de pe calea de sinteză a ureei (*Figura 9.7*):

1. defectul de carbamil-fosfat-sintetază - hiperamonemia tip I;
2. defectul de OCT - hiperamonemia tip II;
3. defectul de argininosuccinat-sintetază - citrulinemie;
4. defectul de argininosuccinază - argininosuccinaturie;
5. defectul de arginază - hiperargininemie.

Oricare dintre aceste defecte se manifestă prin simptome specifice intoxicației cu amoniac a cărui concentrație serică poate creşte de la 10-20 μg/dL la 500 μg/dL încă din prima săptămână după naştere. De asemenea, aceste defecte enzimatice se caracterizează şi prin retard mental.

Subiecții cu astfel de defecte genetice au o intoleranță şi o repulsie față de alimentele bogate în proteine.

9.4.3.2 Catabolismul scheletului de atomi de carbon al aminoacizilor

În funcție de compuşii ce pot fi sintetizați din produşii finali ai căilor de degradare, aminoacizii pot fi grupați în trei categorii:

1 - aminoacizii glucogenici care sunt degradați la piruvat sau la intermediari din ciclul Krebs, compuşi ce vor fi convertiți la glucoză, via fosfoenolpiruvat (alanina, arginina, acidul aspartic, cisteina, acidul glutamic, glicina, histidina, hidroxiprolina, metionina, prolina, serina, treonina şi valina);

2 - aminoacizi cetogenici care sunt cataboliza ți fie la acetil-CoA, fie la acetoacetil-CoA, din care vor rezulta corpi cetonici (leucina);

3 - aminoacizi glucogenici şi cetogenici care pot genera atât glucoză cât şi corpi cetonici (izoleucina, lisina, fenilalanina, triptofanul şi tirozina).

EDITURA UNIVERSITY LIBRARY

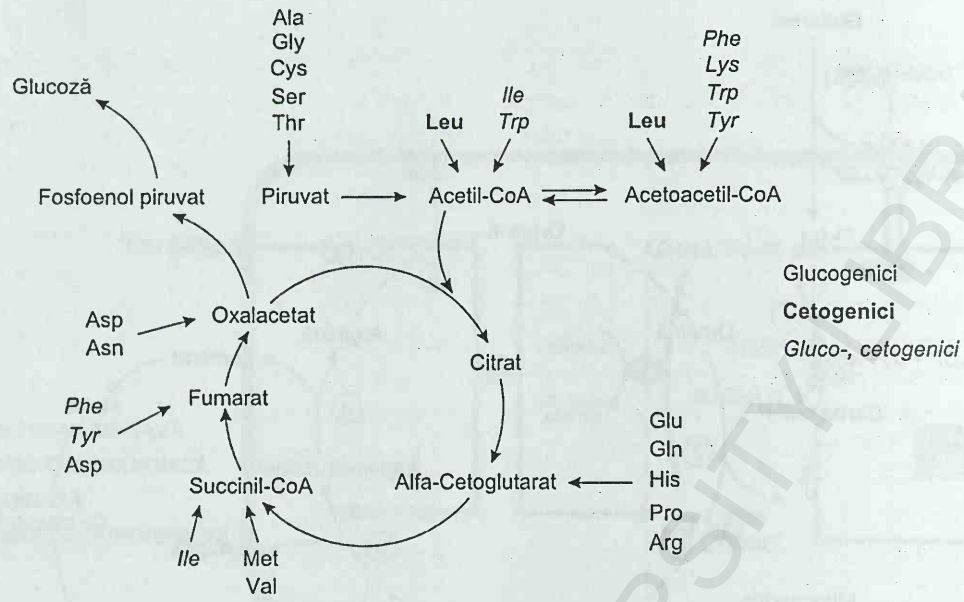


Figura 9.8. Metabolismul general al aminoacizilor. Punctele de intrare ale aminoacizilor în ciclul Krebs

Punctele de intrare ale aminoacizilor în ciclul Krebs sunt acetil-CoA, α-cetoglutarat, succinil-CoA, fumarat şi oxalacetat (*Figura 9.8*).

9.4.3.3 Metabolismul individual al unor aminoacizi

9.4.3.3.1 Metabolismul glicocolului, serinei, treoninei (*Figura 9.9*)

Glicocolul este un aminoacid neesenţial care poate participa la numeroase reacţii metabolice în organism:

- transformarea reversibilă în serină prin intervenţia serin hidroximetil-transferazei, reacţie la care participă în calitate de coenzimă acidul folic sub forma N5-N10-metilen-FH4. Reacţia poate continua cu formarea finală a acidului piruvic;
- sinteza hemului, împreună cu succinil-CoA;
- sinteza glutationului;
- sinteza purinelor;
- sinteza creatinei;
- reacţii de conjugare
- glicocolul se poate transforma reversibil în bioxid de carbon şi amoniac, sub acţiunea complexului enzimatic glicin-sintetază, complex care are drept coenzime acidul folic şi NAD^+ şi care este localizat la nivelul mitocondriei hepatice.

Hiperglicinemia noncetonică este datorată defectului genetic al complexului glicin sintetază

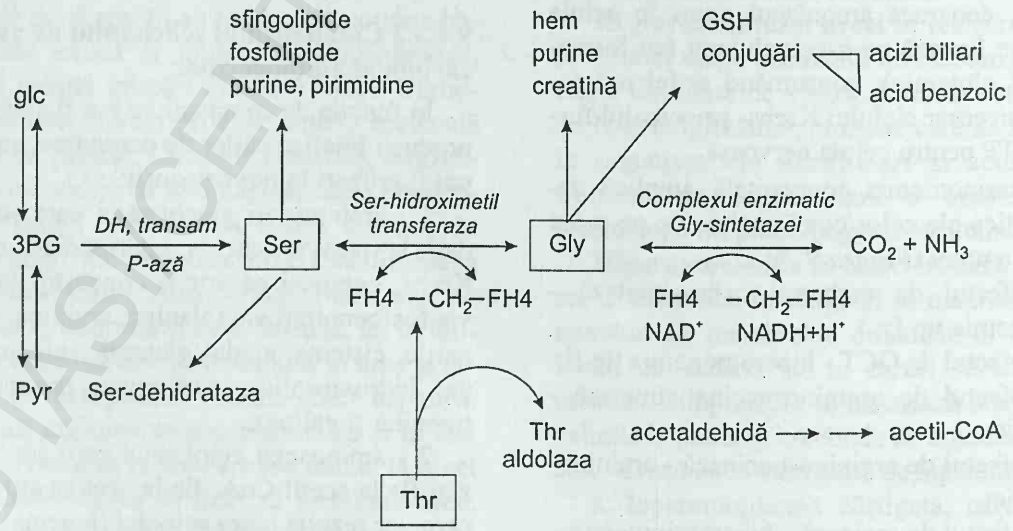


Figura 9.9. Metabolismul glicocolului, serinei, treoninei.
Glc – glucoza; 3PG- 3fosfoglicerat; Pyr-piruvat; DH-dehidrogenaza; Transam-transaminaza; P-aza-fosfataza; FH4-acid tetrahidrofolic;

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

având o incidență de 1:150000 de naşteri. Se caracterizează prin creşterea concentrației glicinei în ficat, creier, sânge şi urină. Caracteristic este creşterea glicinei în lichidul cefalorahidian cu scăderea raportului glicină plasmatică/ glicină în LCR. Creşterea glicinei la nivel cerebral explică simptomatologia neurologică a subiecților cu acest defect enzimatic, deoarece glicina este un potent neurotransmițător inhibitor. Boala se caracterizează prin atacuri epileptice şi hipotonie care rapid pot duce la insuficiență respiratorie fatală. Nu există un tratament eficient şi pacienții, chiar cu formă uşoară a bolii prezintă retard mintal.

Creatinogeneza

Creatina se găseşte în special în mușchi şi creier, atât liberă cât şi fosforilată (fosfocreatină). Sinteza ei se realizează cu participarea a trei aminoacizi, glicocolul, arginina şi metionina prin următoarele etape:

- transamidinarea – transferul grupării amidinice din arginină pe glicocol cu formarea glicociaminei (acid guanidin-acetic). Reacția are loc în rinichi, dar nu în ficat şi mușchi.
- transmetilarea – transferul grupării metil de pe metionina activată (S-adenozil-metionina, SAM) pe glicociamină. Reacția are loc în ficat concomitent cu fosforilarea.

În mușchi creatina, în repaus, în prezența creatin-kinazei (CK) şi ATP-ului regenerează cel de-al doilea compus macroergic al mușchiului – creatinfosfatul. În contracție, în primele minute, mușchiul utilizează creatinfosfatul pentru menținerea unui nivel corespunzător al ATP-ului.

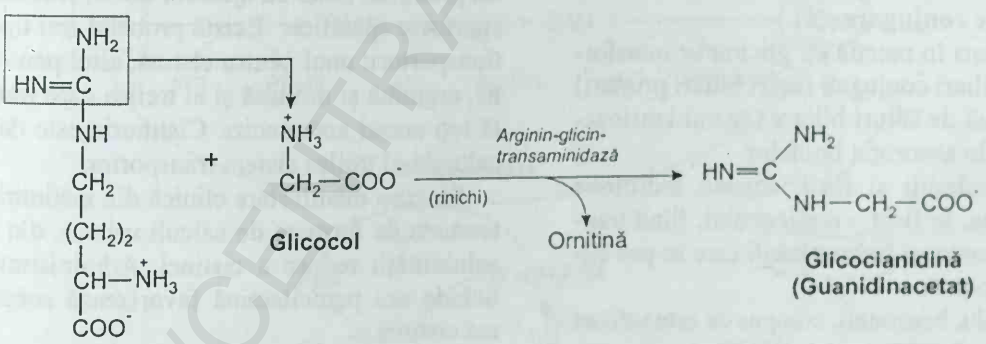
În practica medicală dozarea CK şi a izoenzimelor sale oferă un indiciu în depistarea leziunilor mușchiului cardiac cât şi scheletic.

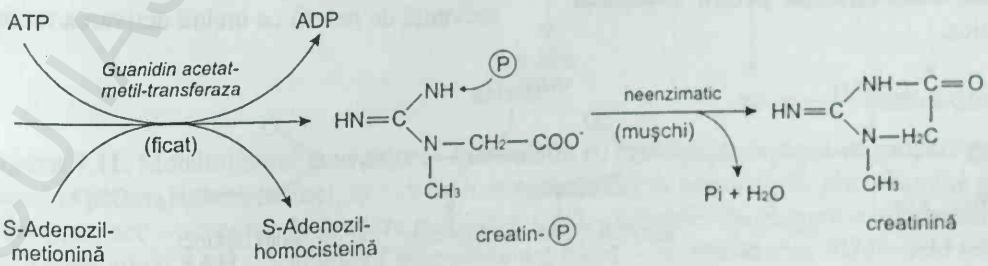
Forma de excreție a creatinei este creatinina (anhidrida creatinei) care rezultă prin eliminarea neenzimatică a apei şi fosfatului anorganic din creatină respectiv din creatinfosfat. Deoarece la nivel renal, creatinina este doar filtrată, reprezintă un marker valoros al evaluării ratei de filtrare glomerulare. Concentrația plasmatică a creatinei este 0,2-0,6 mg/dL, iar a creatininei 0,7-1,2 mg/dL la bărbați şi 0,5-1,0 mg/dL la femei. Cantitatea de creatinină excretată prin urină în 24 de ore este constantă pentru un subiect dat, depinzând de masa musculară şi de funcția renală.

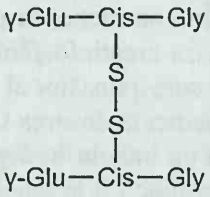
Biosinteza glutationului

Glutationul, un tripeptid cu grupare sulfhidrică, este un important derivat al aminoacizilor, având funcții fiziologice însemnate.

Glutationul, prezent în celulele animale în concentrații înalte (aproximativ 5 mM) reprezintă un important sistem redox, trecând reversibil din forma redusă (GSH) în forma oxidată (GSSG), în care două molecule de tripeptid se leagă prin legătură disulfidică.







GSSG este redus la GSH prin glutation-reductază, o flavoproteină ce utilizează NADPH ca sursă de electroni. În cele mai multe celule raportul GSH/GSSG este mai mare decât 500.

Glutationul îndeplineşte unele funcţii importante:

- Glutationul protejează proteinele celulare (enzime, hemoglobină) împotriva agenţilor oxidanţi, jucând rol cheie în degradarea peroxidului de hidrogen şi peroxizilor organici, compuşi toxici pentru organism.
- Glutation peroxidaza (GSH-PX), enzima ce catalizează reacţia, conţine un atom de seleniu. În centrul activ al enzimei se găseşte un analog al cisteinei ce conţine seleniu în locul sulfului.
- Participă la transportul aminoacizilor în celule;
- Participă la biosinteza leucotrienelor.
- La nivelul ficatului GSH, compus nucleofil, participă la reacţia de conjugare prin care unele toxice electrofile (cum ar fi agenţi cancerigeni) sunt neutralizaţi prin acţiunea unor glutation-S-transferaze conform reacţiei:

$$R\text{-}OH + GSH \rightarrow GS\text{-}R + H_2O.$$

Reacţia de conjugare

Acizii biliari în reacţia cu glicina se transformă în acizi biliari conjugaţi (acizi biliari primari) care sub formă de săruri biliare (agenţi tensioactivi) intervin în absorbţia lipidelor.

Mulţi metaboliţi şi medicamente hidrofobe sunt conjugate, în ficat, cu glicocolul, fiind transformate în compuşi hidrosolubili care se pot elimina din organism.

De exemplu, benzoatul, compus ce este utilizat pentru conservarea alimentelor, în ficat, se conjugă cu glicocolul rezultând acid hipuric.

Capacitatea ficatului de a converti benzoatul la acid hipuric este utilizată pentru evaluarea funcţiei hepatice.

Serina este un aminoacid neesenţial care poate fi convertit fie în acid piruvic, fie în glicocol (*Figura 9.9*). Intervine în sinteza sfingolipidelor, a fosfolipidelor, a colinei.

Treonina este un aminoacid esenţial şi de aceea trebuie adus în organism prin alimentaţie. Sub acţiunea enzimei treoninaldolazei (piridoxal dependente), se transformă în acetaldehidă şi glicocol. Acetaldehida prin oxidare şi activare trece în acetil CoA.

9.4.3.3.2 Metabolismul cisteinei

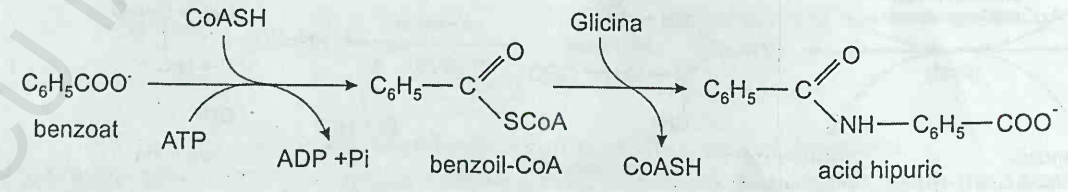
Cisteina se poate metaboliza la acid piruvic prin oxidare, transaminare şi desulfurare (*Figura 9.10*). Cisteina intervine în sinteza fosfo-adenozil-fosfosulfatului, fiind donator de sulf al organismului. Prin oxidare formează cistină, iar prin decarboxilare tioetanolamină, compus ce intervine în sinteza coenzimei A şi a 4'-fosfopanteteinei. Zilnic, organismul uman excretă între 0,64-0,96 g sulf, în principal anorganic. Acesta provine în principal din degradarea cistinei (disulfura cisteinei) care sub acţiunea cistin-reductazei trece în cisteină.

Cistinuria (cistin-lisinuria) este consecinţa unui defect genetic la nivelul unui transportor de aminoacizi la nivelul membranei tubulare a nefronului. Se caracterizează prin eliminare urinară crescută de cistină, lizină, arginină şi ornitină. În mod normal aceşti aminoacizi sunt filtraţi la nivel glomerular şi apoi reabsorbiţi la nivelul tubului proximal renal cu ajutorul unor proteine transportoare specifice. Există probabil trei tipuri de transportori: unul pentru cistină, altul pentru lizina, arginină şi ornitină şi al treilea care transportă toţi aceşti aminoacizi. Cistinuria este datorată celui de-al treilea sistem transportor.

Singura manifestare clinică din cistinurie este tendinţa de formare de calculi urinari, din cauza solubilităţii reduse a cistinei. Administrarea de lichide sau penicilamină favorizează solubilizarea cistinei.

9.4.3.3.3 Metabolismul metioninei

Metionina, aminoacid esenţial, este metabolizată în organism pe calea succinatului printr-o secvenţă de reacţii ce includ activarea metioninei



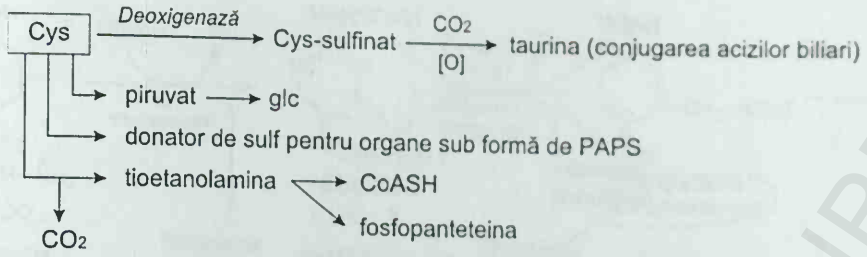


Figura 9.10. Reprezentare schematică a metabolismului cisteinei

la S-adenozil metionină, urmată de formarea în fază intermediară a homocisteinei (*Figura 9.11*).

Homocisteina poate condensa cu serina, în prezența cistationin –sintetazei, piridoxal dependentă, cu formarea unui intermediar cistationina, care prin clivare va determina formarea cisteinei.

Homocistinuria reprezintă un grup de afecțiuni caracterizate prin creșterea homocisteinei la nivelul țesurilor organismului. Incidența bolii este de 1:200.000 de cazuri. Se datorează defectului de cistationin β-sintază sau defectului de metilare a homocisteinei.

Defectul de cistationin β-sintază reprezintă cauza cea mai frecventă de homocistinurie. Datorită blocajului existent între homocisteină și cistationină (*Figura 9.11*) homocisteina și precursorul său- metionina- se acumulează în organism, cu scăderea cisteinei și a cistinei. Urina acestor pacienți va conține homocisteină și alți compuși cu sulf: metionină, metionin-sulfoxid, etc. Simptomatologia apare treptat, după perioada neonatală, cu semne la nivel ocular, scheletic, vascular. Cele mai grave forme sunt datorate trombozelor vasculare și arteriale care pot duce la decese chiar din primii ani de viață. Retardul mental care apare la aproximativ 40% din cazuri s-ar putea datora trombozelor cerebrale.

Din punct de vedere genetic boala este în general heterozigotă, cu scăderea parțială sau totală a activității enzimatice. De aceea bonavii pot fi tratați cu doze mari de piridoxină, un cofactor al enzimei defective. La subiecții la care activitatea enzimatică este zero, se indică o dietă săracă în metionină și suplimentată cu cistină.

Creșterea homocisteinei serice este legată de patogeneza bolilor cardiovasculare. Numeroase studii au arătat că homocisteina reprezintă un factor de risc independent pentru bolile cardio-

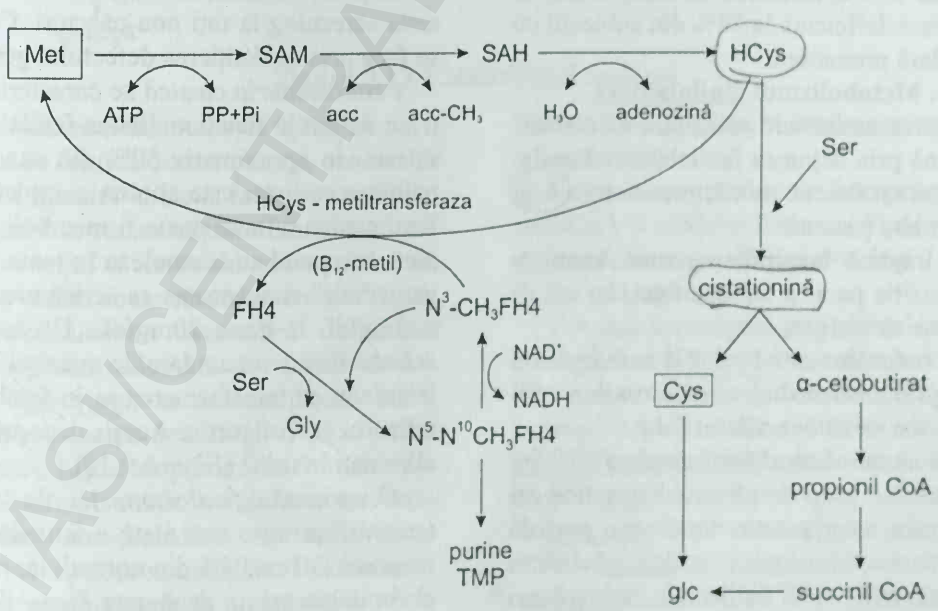


Figura 9.11. Metabolismul metioninei - interrelația cu cisteina; acceptorii de grupări metil pot fi etanolamina pentru sinteza colinei, noradrenalina pentru sinteza adrenalinei, glicociamina pentru sinteza creatinei etc; acc – acceptor de grupare metil; acc-CH3 – acceptor de grupare metil metilat; SAM-S – adenozil metionina; SAH – S adenozil homocisteina; Hcys – homocisteina; FH4 – acid tetrahidrofolic; glc – glucoza; TMP – acid timidilic monofosfat

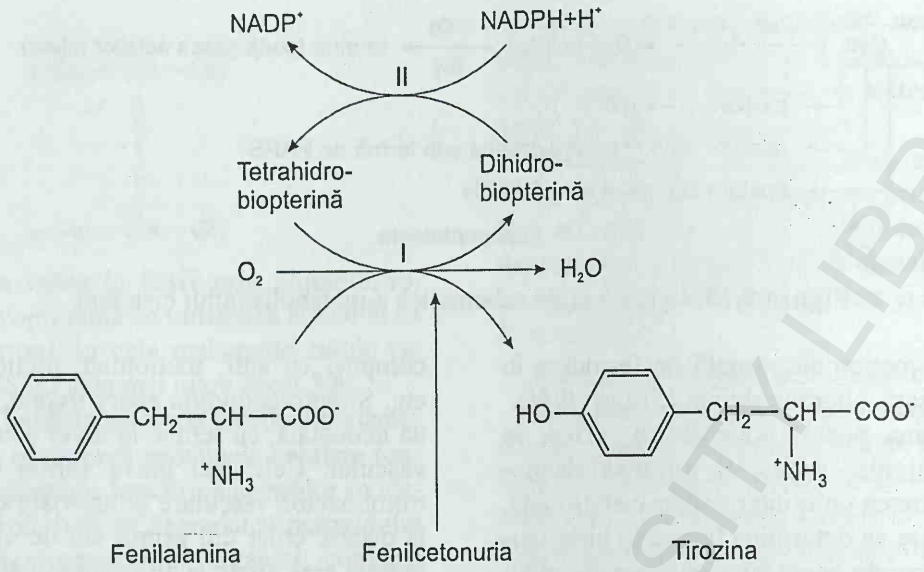


Figura 9.12. Metabolismul fenilalaninei. I = fenilalanin hidroxilaza, II = dihidrobiopterin reductaza

vasculare. Mecanismele fiziopatologice care leagă aceste două entități nu sunt clar elucidate. Se știe că homocisteina se poate metaboliza la metionină în prezența acidului folic și vitaminei B_{12} sau la cisteină, în prezența viatminei B_6. Lipsa acestor vitamine duce la acumularea de homocisteină și la dezvoltarea în timp a aterosclerozei. De asemenea, deficiența unor enzime poate determina creșteri ale homocisteinei serice. De exemplu metilen –tetrahidofolat reductaza, enzimă implicată în tranformarea homocisteinei în metionină, este deficientă la 28% din subiecții cu boală vasculară prematură.

9.4.3.3.4. Metabolismul fenilalaninei

Fenilalanina, aminoacid esențial, este convertită la tirozină prin acțiunea fenilalaninhidroxilazei, o oxidază cu funcție mixtă, prezentă în ficat și absentă în alte țesuturi.

Reacția implică încorporarea unui atom de oxigen în poziția para- a fenilalaninei, iar cel de al doilea atom de oxigen, în apă.

Agentul reducător este NADPH care cedează hidrogenii prin intermediul tetrahidroxibiopterinei, compus asemănător acidului folic.

Anomalii în metabolismul fenilalaninei

Reprezintă un grup de afecțiuni genetice caracterizate prin incapacitatea totală sau parțială de transformare a fenilalaninei în tirozină datorată în principal deficienței fenilalanin-hidroxilazei (I). Totuși 1-3% din hiperfenilalaninemii se datorează fie defectului dihidrobiopterin reductazei (II) sau unei enzime pe calea de sinteză a biopterinei. Incidența bolii este de 1:10.000 de nașteri. Clinic se caracterizează prin retard mental sever. La naștere copiii sunt aparent sănătoși, iar ulterior dezvoltă semne nespecifice: dezvoltare întârziată, dificultăți în deglutiție, stări de vomă. Unii copii dezvoltă un miros caracteristic secundar producției crescute de acid fenilpiruvic. Fără tratament, retardul mental progresează și devine ireversibil. Unii dezvoltă în timp hipopigmentație, deoarece fenilalanina în cantități mari inhibă tirozinaza, enzima responsabilă de transformarea tirozinei în pigment melanic.

În țările occidentale diagnosticul se face prin teste screening la toți nou-născuții. Confirmarea se face prin evidențierea defectului genetic.

Fenilcetonuria clasică se caracterizează printr-un deficit în funcționalitatea fenilalanin-hidroxilazei. În aproximativ 50% din cazuri funcționalitatea enzimei este abolită complet. Deoarece fenilalanina nu mai poate fi metabolizată în tirozină, începe să se acumuleze în toate fluidele organismului concentrația sa serică crescând de la < 2mg/dL la peste 20mg/dL. De asemenea, se activează căile secundare de metabolizare a fenilalaninei, cu transformarea sa în fenilpiruvic, fenillactic și fenilacetic. Acești derivați sunt rapid eliminați în urină (*Figura 9.12*).

O variantă a fenilcetonuriei clasice se caracterizează printr-o activitate a fenilalaninhidroxilazei scăzută cu 94% din normal, iar nivelul seric al fenilalaninei nu depășește 8 mg/dL. În această formă cetonuria poate fi absentă.

Hiperfenilalaninemia neonatală, tranzitorie, se datorează unor sisteme enzimatice hepatice insuficient maturate la naștere, iar nivelul fenilalaninei nu depășește 12 mg/dL.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

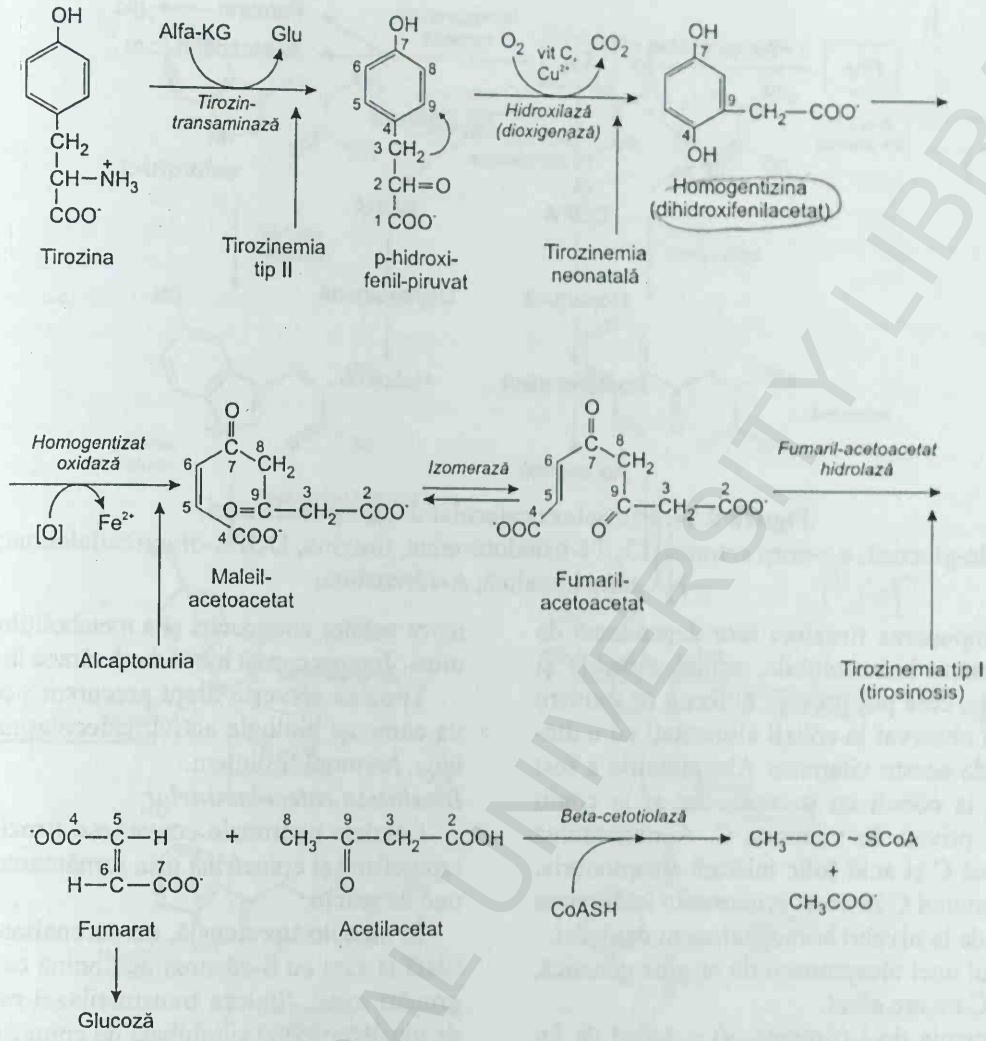


Figura 9.13. Catabolismul tirozinei

Hiperfenilalaninemia maternă apare la paciente gravide cu fenilcetonurie clasică, care au ținut un regim igienico-dietetic încă din copilărie, ajungând astfel la vârsta adultă. Cantitățile mari de derivați cetonici ai fenilalaninei trec placenta, determinând efecte dezastruase la nivelul fătului.

Hiperfenilalaninemia secundară deficitului de dihidrobiopterin reductază sau a unui deficit în sinteza biopterinei, se caracterizează clinic prin diverse sindroame neurologice, ce se instalează progresiv. Lipsa biopterinei în forma sa activă, va determina o scădere a sintezei serotoninei, dopaminei, noradrenalinei, toți acești compuși având rol de neurotransmițători. Tratamentul constă în administrarea de precursori ai acestor neurotransmițători sau de biopterină.

9.4.3.3.5 Metabolismul tirozinei

Tirozina este un aminoacid care se poate sintetiza în organism din fenilalanină. Este precursorul hormonilor tiroidieni, medulosuprarenalieni, pigmentului melanic.

Degradarea tirozinei se face pe calea acetoacetil-CoA și acidului fumaric (*Figura 9.13*).

Anomalii în catabolismul tirozinei

Alcaptonuria

Cea mai importantă etapă în calea metabolică de degradare a tirozinei este deschiderea nucleului aromatic catalizată de homogentisinat oxidaza (reacția 3). Absența ei conduce la acumularea acidului homogentisinic în țesuturi și eliminarea lui prin urină. Urina care conține homogentisinat se înnegrește în prezența aerului prin transformare în acid benzochinonacetic și polimerizarea acestuia la pigmentul brun "alcapton". Alcaptonuria a fost descrisă încă din 1649 și definită ca defect enzimatic de Archibald Garrod în 1902.

Depunerea de alcapton în cartilagii duce la colorarea acestora în brun (ocronoză) asociată clinic cu simptome de artroză.

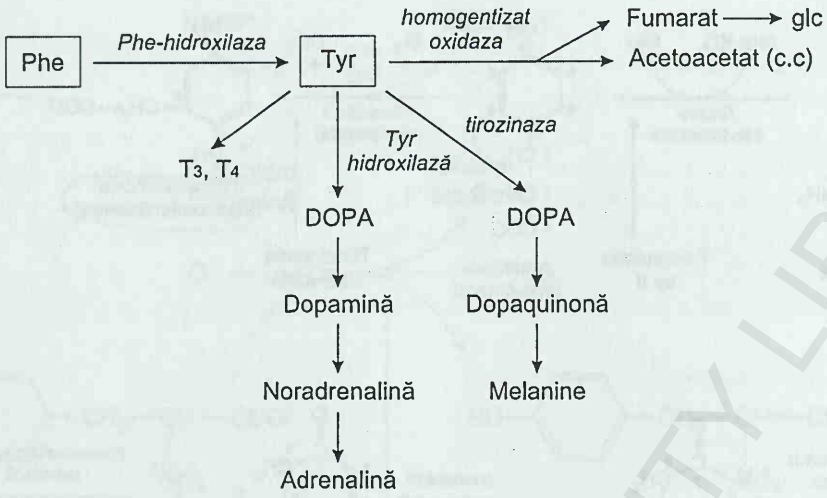


Figura 9.14. Biosinteza catecolaminelor şi melaninei.
glc-glucoză; c.c-corp cetonic; T3, T4-triiodotironina, tiroxina; DOPA-dioxifenilalanina; NA-noradrenalină; A-adrenalină;

Descompunerea tirozinei este dependentă de două vitamine hidrosolubile, acidul ascorbic şi acidul folic, care pot preveni defectul de oxidare a tirozinei observat la cobaii alimentaţi cu o dietă lipsită de aceste vitamine. Alcaptonuria a fost observată la cobaii cu scorbut, dar şi la copiii prematuri privaţi de vitamina C. Administrarea de vitamină C şi acid folic înlătură alcaptonuria. Rolul vitaminei C în acest proces este înlăturarea inhibiţiei de la nivelul homogentizinat oxidazei.

În cazul unei alcaptonurii de origine genetică, vitamina C nu are efect.

Tirozinemia tip I (tirosinosis) – defect de fumaril-acetoacetat-hidrolază (reacţia 4) şi posibil de maleilacetoacetat-hidrolază; se produce acumularea metaboliţilor ce afectează sistemele de transport intracelular al aminoacizilor.

Tratamentul constă într-o dietă cu concentraţii scăzute de fenilalanină, tirozină şi ocazional de metionină.

Tirozinemia tip II, sindromul Richner-Hanhart, este cauzat de lipsa tirozin-transaminazei hepatice (reacţia 1) care conduce la creşterea concentraţiei de tirozină în plasmă. Se produc leziuni caracteristice la ochi şi piele, întârziere mintală moderată, automutilare şi perturbări de coordonare.

În urină este crescută tirozina, alături de metaboliţii ei: p-hidroxipiruvat, p-hidroxifenillactat , p-hidroxifenilacetat, N-acetiltirozină şi tiramină.

Tirozinemia neonatală– defect de p-hidroxifenilpiruvat hidroxilază (reacţia 2), conduce la creşterea tirozinei şi fenilalaninei în sânge şi eliminarea acestor aminoacizi şi a metaboliţilor lor prin urină. Terapia constă într-o dietă săracă în proteine.

Tirozina serveşte drept precursor pentru câţiva compuşi biologic activi: catecolamine, melanine, hormoni tiroidieni.

Biosinteza catecolaminelor

Celulele neuronale convertesc tirozina la norepinefrină şi epinefrină prin următoarea succesiune de reacţii:

În medulosuprarenală, noradrenalina este metilată la azot cu S-adenozilmetionină ca donor de grupări metil. Sinteza transmetilazei este indusă de glucocorticoizi şi inhibată de epinefrină.

Sinteza melaninei

Are loc în melanocite pe calea DOPA, reacţia de hidroxilare fiind catalizată de o tirozin-hidroxilază dependentă de cupru. DOPA este apoi oxidată la Dopachinonă şi în final prin polimerizare trece în melanină (*Figura 9.14).*

Albinismul reprezintă un grup de sindroame clinice caracterizate prin deficit de melanină, localizate la ochi şi piele. Semnele clinice comune pentru toate cele zece forme de albinism uman oculocutanat includ scăderea pigmentării pielii şi ochilor; diferenţierea se bazează pe caracteristicile lor clinice, biochimice, ultrastructurale sau genetice.

Enzima defectivă în albinism este tirozin-hidroxilaza din melanocite. În unele forme, cauza este un defect în transportul tirozinei prin membrană.

Biosinteza hormonilor tiroidieni

Glanda tiroidă secretă doi derivaţi ai tirozinei: tiroxina sau T_4 (3,3',5,5'-tetraiodtironină) şi T_3 (3,3'5'-triiodtironină).

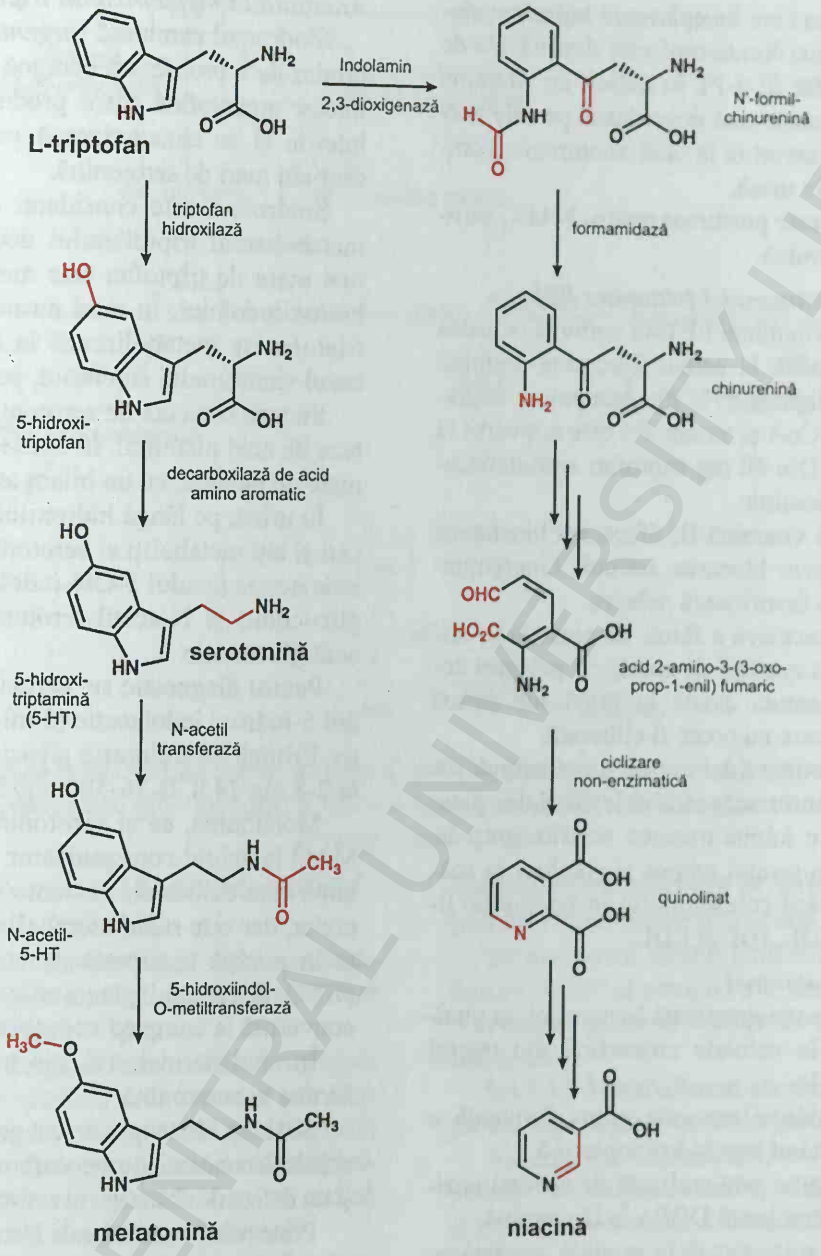


Figura 9.15. Metabolismul triptofanului

Hormonii se formează în celulele foliculare din glanda tiroidă prin iodurarea resturilor de tirozină din tiroglobulină.

Monoiodtirozina (MIT) şi diiodtirozina (DIT) formaţi reacţionează pentru a forma T_3 şi T_4.

Tiroglobulina iodurată este păstrată în lumenul foliculilor tiroidieni şi hidrolizată pentru eliberarea T_3 şi T_4 care trec în circulaţie.

T_3 este forma activă fiind aptă să se fixeze pe receptorii din nucleii celulari. Aproximativ 2/3 din T_3 plasmatic rezultă prin deiodurarea T_4 în ţesuturile periferice.

9.4.3.3.6. Metabolismul triptofanului

Triptofanul se descompune pe calea kinureninã - acid antranilic, prin care patru atomi de carbon sunt convertiţi la acetoacetil-CoA şi doi, la acetil-CoA (*Figura 9.15*). Calea este importantă deoarece serveşte atât pentru descompunere cât şi pentru convertirea triptofanului la nicotinamidă.

Sub acţiunea triptofan oxigenazei (triptofan-pirolază) are loc clivarea nucleului indolic prin oxidare rezultând N-formil-kinurenina, care prin hidroliză pierde radicalul formil şi trece în kinurenină. Aceasta, prin hidroxilare, formează 3-hidroxi-kinurenină.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Kinureninaza care îndepărtează hidrolitic alanina din 3-hidroxi-kinurenină este dependentă de piridoxal-5-fosfat (P-5-P). În deficit de vitamina B_6, kinurenina nu se mai degradează pe cale normală, ci este convertită la acid xanturenic, compus identificat în urină.

Triptofanul este precursor pentru NAD^+, serotonină şi melatonină.

Biosinteza nicotinamidei (vitamina PP)

Biosinteza vitaminei PP este comună cu calea de degradare până la acidul 2-acroleil-3-amino fumaric. Mai departe 97% din compus se degradează la acetil-CoA şi numai 3% este convertit la acid nicotinic. Din 60 mg triptofan se sintetizează 1 mg acid nicotinic.

Deficitul de vitamină B_6 afectează biosinteza vitaminei PP prin blocarea acţiunii kinureninazei, condiţie ce favorizează pelagra.

Utilizarea excesivă a făinii de porumb în alimentaţie crează condiţii de apariţie a pelagrei deoarece nicotinamida există în făină sub formă complexă din care nu poate fi eliberată.

Acidul nicotinic (dar nu şi nicotinamida) a fost utilizat pentru scăderea colesterolului plasmatic, deoarece inhibă trecerea acizilor graşi liberi (AGL) din ţesutul adipos şi conduce la scăderea încorporării colesterolului în fracţiunile lipoproteice VLDL, IDL şi LDL.

Biosinteza serotoninei

Serotonina este sintetizată în neuroni, în glanda epifiză şi în celulele cromafine din tractul gastrointestinal.

Triptofan-hidroxilaza este etapa limitantă a sintezei necesitând tetrahidrobiopterină.

Decarboxilarea este realizată de aceeaşi enzimă care decarboxilează DOPA la Dopamină.

Serotonina este stocată în granule asociată cu ATP. Serotonina (enteramina sau trombocitina) este vasoconstrictor şi stimulator al musculaturii netede. Ea participă la reglarea activităţii nervoase superioare.

Catabolismul serotoninei duce la formarea de derivaţi indolici care sunt excretaţi prin urină sub formă de sulfo şi glucuronoconjugaţi.

Biosinteza melatoninei

Melatonina este un hormon produs de glanda epifiză care are efecte asupra sistemului hipotalamus-hipofiză.

Se formează prin acetilarea la azot a serotoninei, urmată de metilarea la gruparea –OH din poziţia 5.

Anomalii în metabolismul triptofanului

Sindromul carcinoid (*argenta carcinoma*) este produs de o proliferare benignă sau malignă a celulelor argentofine (care produc serotonină) din intestin şi se caracterizează prin producerea de cantităţi mari de serotonină.

Sindromul este considerat ca o anomalie în metabolismul triptofanului deoarece o cantitate mai mare de triptofan este metabolizat pe calea hidroxiindolului. În mod normal, numai 1% din triptofan se metabolizează la serotonină, dar în cazul sindromului carcinoid, peste 60%.

Sinteza crescută de serotonină scade mult sinteza de acid nicotinic. În consecinţă apar simptomele de pelagră, cu un bilanţ azotat negativ.

În urină, pe lângă hidroxiindol, pot fi identificaţi şi alţi metaboliţi ai serotoninei: acidul 5-OH-indolacetic (acidul 5-OH-indolacetic conjugat cu glicocolul) şi N-acetil-serotonina, conjugată cu acid glucuronic.

Pentru diagnostic se cercetează în urină acidul 5-hidroxi indolacetic (3 ml urină + 3 ml reactiv Erhlich → coloraţie albastră), care creşte de la 2-8 mg/24 h, la 76-580 mg/24 h.

Melatonina, ca şi serotonina, este oxidată de MAO la acidul corespunzător. Melatonina circulantă este distribuită în toate ţesuturile, inclusiv creier, dar este rapid metabolizată prin hidroxilare în poziţia 6, urmată de conjugarea cu sulfat (70%) şi cu acid glucuronic (6%). Restul este convertită la compuşi neindolici.

În mod normal, 1% din triptofan este transformat în serotonină.

Sindrom Hartnup – defect genetic de transport al acizilor monoaminomonocarboxilici. Paralel există şi un defect de absorbţie al acestor aminoacizi.

Principala cauză în boala Hartnup este deficitul de triptofan – aminoacid esenţial necesar atât pentru sinteza de proteine cât şi pentru sinteza vitaminei PP. Din acest motiv manifestările clinice sunt similare celor din pelagră (leziuni cutanate ale pielii expusă la lumina solară, ataxie cerebeloasă reversibilă şi confuzie mintală de diferite grade). Fenomenele se ameliorează prin administrarea de vitamină PP. Deşi este deficit de triptofan, nu apar fenomene de carenţă proteică, probabil datorită absorbţiei unor lanţuri polipeptidice care conţin triptofan.

Din triptofanul neabsorbit şi supus acţiunii bacteriilor intestinale rezultă indol care se absoarbe şi se elimină apoi prin urină sub formă de sulfoconjugaţi (indican).

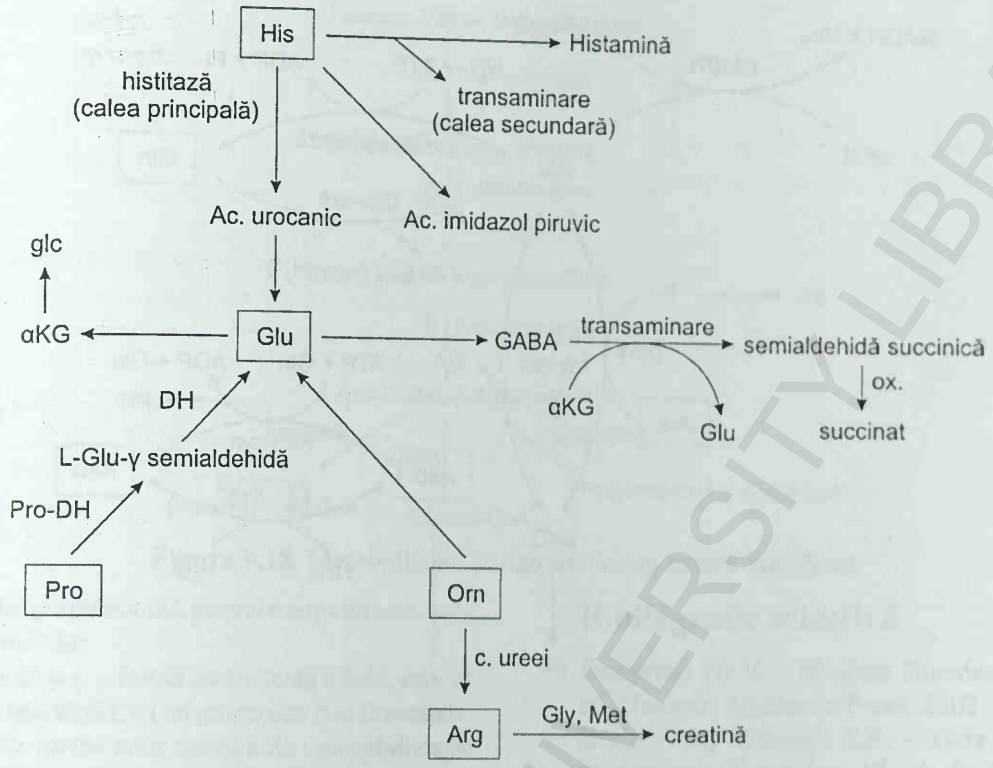


Figura 9.16. Metabolismul histidinei, acidului glutamic, prolinei şi argininei; transam - transaminază; glc - glucoză; α KG – α-cetoglutarat; DH – dehidrogenază; Orn - ornitină; c. ureei – ciclul ureei

9.4.3.3.7 Metabolismul histidinei, acidului glutamic, prolinei, argininei

Schematic, interconversiunea dintre aminoacizi cât şi principalele căi de metabolizare sunt schematizate în *Figura 9.16.*

Histidina participă la mai multe căi metabolice: poate fi convertită la acid urocanic sub acţiunea histidazei (calea majoră de metabolizare) sau prin transaminare, rezulă acid imidazolpiruvic. Prin decarboxilare rezultă histamină, amină biogenă cu importante roluri în organism.

Acidul urocanic este fi converit în acid glutamic.

Histidinemia este un defect genetic al histidazei, prima enzimă de pe calea principală de metabolizare, ceea ce va determina o creştere a histidinei în ser. Sunt activate căile secundare de metabolizare ale acestui aminoacid, cu apariţia în urină a imidazolpiruvatului şi a altor metaboliţi. Incidenţa globală a acestei maladii este de 1:20.000, dar în Japonia incidenţa este de 1:8.000. Majoritea pacienţilor prezintă o dezvoltare neuro-psihică normală, totuşi s-au descris cazuri de retard mental şi dificultăţi în vorbire.

Acidul glutamic este un aminoacid neesenţial care poate fi convertit în alţi aminoacizi: prolină, ornitină, glutamină. Poate intra în ciclul Krebs prin transformare în alfacetoglutarat, sau prin decarboxilare rezultă acidul γ-aminobutiric.

De asemenea, acidul glutamic reprezintă „colectorul final" al amoniacului din aminoacizi.

Prolina poate fi convertită în acid glutamic sau ornitină.

9.4.3.3.8 Metabolismul alaninei, acidului aspartic, asparaginei, acidului glutamic, glutaminei

Alanina, prin transaminare, este convertită în acid piruvic. Toţi cei patru atomi ai acidului aspartic cât şi ai asparaginei se regăsesc în acidul oxalacetic (*Figura 9.17).* Analog, acidul glutamic şi glutamina se transformă în acid α-cetoglutaric, prin transaminare.

Acidul glutamic reprezintă „colectorul final" al amoniacului din aminoacizi, datorită reacţiilor de transaminare cât şi de dezaminare oxidativă.

Ambii aminoacizi dicarboxilici - acidul aspartic şi acidului glutamic - se pot transforma în amidele lor – glutamina şi asparagina. Glutamina reprezintă forma de transport a amoniacului în sânge.

9.4.3.3.9. Metabolismul aminoacizilor ramificaţi

Leucina, valina şi izoleucina se degradează în fază iniţială prin reacţii comune în urma cărora rezultă resturi acil-CoA αβ-nesaturate care, mai departe, pe căi separate, vor conduce la compuşi diferiţi (*Figura 9.18*). Structura acestor compuşi

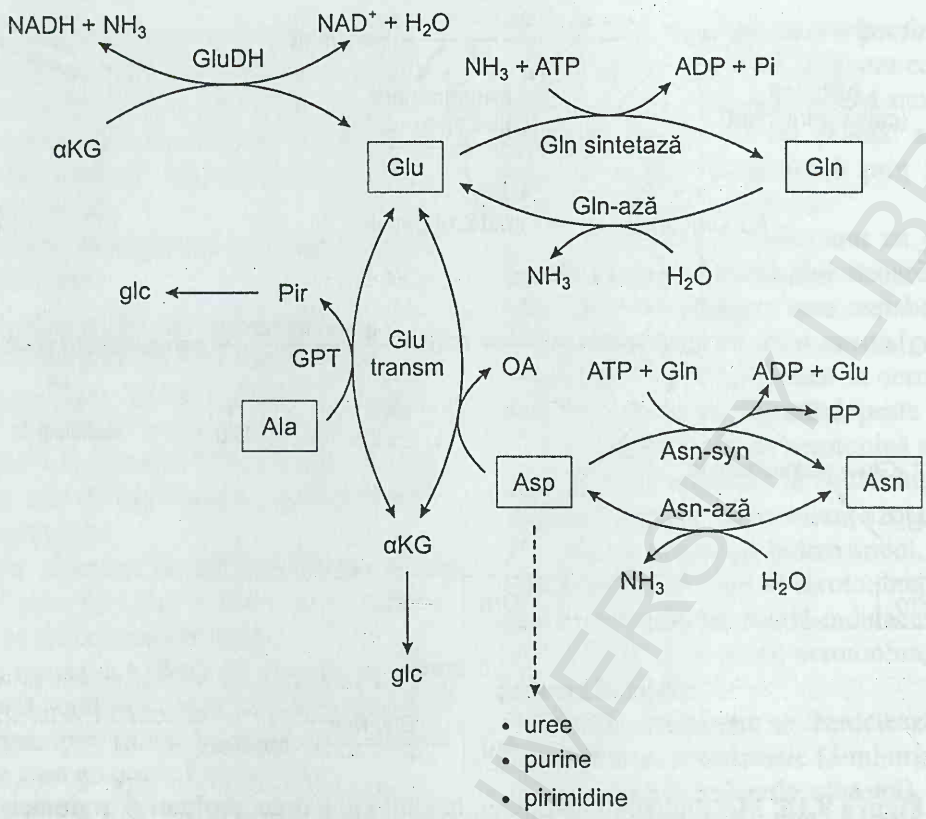


Figura 9.17. Metabolismul alaninei, acidului aspartic, asparaginei, acidului glutamic, glutaminei; glc – glucoză; α KG – α cetoglutarat; Glu transm – glutamic transaminaza; GluDH – glutamatdehidrogenază; Gln-ază – glutaminază; Asn-syn – asparagin sintetază; Asn-ază – asparaginază

determină clasificarea aminoacizilor din care provin în glucogenici (valina), cetogenic (leucina) şi cetogenic şi glucogenic (izoleucina).

Reacţia 1, transaminarea, este catalizată de o singură enzimă. Întrucât reacţia este reversibilă, aceşti aminoacizi pot fi înlocuiţi în dietă de cetoacizii respectivi.

Reacţia 2, decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor ramificaţi corespunzători leucinei, izoleucinei şi valinei, este catalizată de un complex enzimatic mitocondrial asemănător în privinţa structurii şi reglării cu piruvat dehidrogenaza. Complexul cuprinde o α-cetoaciddecarboxilază, o transacilază şi o dihidrolipoildehidrogenază.

Reacţia 3 este analoagă cu dehidrogenarea acil-CoA din degradarea acizilor graşi.

Trecerea valinei în succinil-CoA are loc printr-o fază intermediară de metil-malonil-CoA, necesitând drept coenzimă adenozil-cobalamină. Enzima care catalizează această izomerizare este metil-malonil-CoA-mutaza implicată şi în catabolismul propionil-CoA rezultată din degradarea izoleucinei. În deficit de vitamină B_{12}, activitatea mutazei este afectată.

Anomalii în metabolismul aminoacizilor cu catena ramificată

Boala urinii cu miros de arţar (Maple Syrup Urine Disease, Branched Chain Ketonuria) se caracterizează printr-un defect genetic al complexului decarboxilazic de pe calea degradativă a acestor aminoacizi cu radical ramificat. Incidenţa bolii este de 1:250.000 de nou-născuţi. În literatură sunt descrise mai multe variante clinice şi biochimice. În tipul clasic cei trei aminoacizi (leucina, valina, izoleucina) se acumulează în sânge şi se elimină prin urină, împreună cu produşii lor de degradare (ceto şi hidroxiacizi), imprimând urinii un miros de sirop de arţar (asemănător mirosului de zahar caramelizat).

Mecanismul toxicităţii nu este suficient cunoscut. Se presupune că excesul de aminoacizi ramificaţi împiedică transportul intracelular al altor aminoacizi, perturbând astfel sinteza proteinelor. Copilul prezintă tulburări digestive, vomă şi este letargic. Defectul este însoţit de leziuni nervoase severe şi duce la deces în câteva luni.

Depistarea timpurie a deficitului prin analiză enzimatică şi instituirea unei diete sărace în vali-

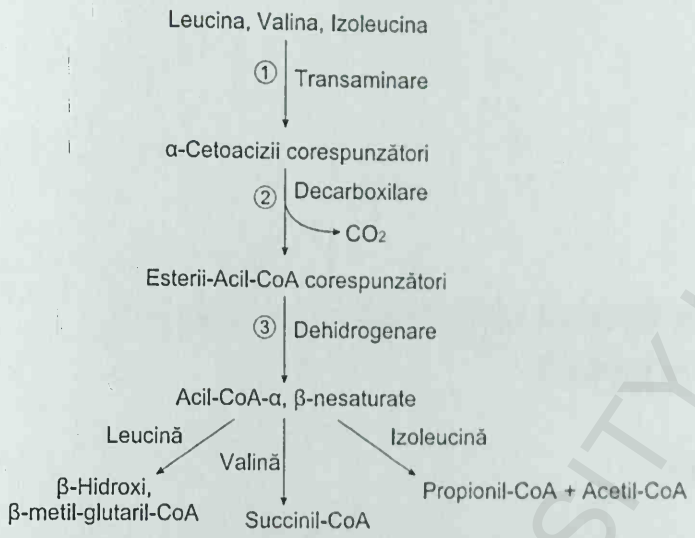


Figura 9.18. Metabolismul aminoacizilor cu catena ramificată

nă, leucină şi izoleucină permite dezvoltarea normală a copilului.

A fost descrisă şi o formă intermitentă a bolii, care se manifestă mai târziu, cu un prognostic mai favorabil.

Ambele forme sunt cauzate de mutaţii diverse în structura primară a aceleaşi enzime.

Hipervalinemia – caracterizată prin creşterea concentraţiei sanguine de valină (dar nu şi de leucină şi izoleucină) indică incapacitatea de a transamina valina la α-cetoizovalerat (reacţia 1), fără afectarea transaminării celorlalţi doi aminoacizi.

Acidemia izovalerică - perturbarea activităţii izovaleril-CoA-dehidrogenazei (reacţia 3) conduce la acumularea de izovaleril-CoA care este hidrolizat la izovalerat şi eliminat prin urină şi transpiraţie. Simptomele includ un miros caracteristic de brânză pentru respiraţie şi fluidele organismului, vomismente, acidoză şi comă, precipitată de ingestia excesivă de proteine.

Aciduria metilmalonică - datorită deficitului de metil-malonil-mutază, dar în primul an de viaţă apare acidoză (pH-ul sângelui arterial având valoarea 7,00) şi se elimină prin urină mari cantităţi de metilmalonat (1 g sau chiar mai mult pe zi) faţă de normal (5 mg/zi).

La unii pacienţi, administrarea parenterală de doze farmacologice de vitamina B_{12} determină o ameliorare a simptomelor, pH-ul sângelui arterial revenind la normal şi scăderea marcată a eliminărilor urinare de metilmalonat. În acest caz, este vorba de un defect de transferază care catalizează sinteza deoxicobalaminei.

Alţi pacienţi nu răspund la administrarea de vitamină B_{12}, defectul fiind situat la nivelul apoenzimei metilmalonilmutazei. Această formă este frecvent letală.

Bibliografie selectivă

1. Bhagavan N. V. - Medical Biochemistry. 4th ed. Harcourt Academic Press, 2002
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. – Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999
3. David L. Nelson and Michael M. Cox – Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. W. H. Freeman & Co, 2004
4. Gaw A., Murphy M.J., Cowan R.A., O'Reilly D.St.J., Stewart M.J., Shepherd J. -Clinical Biochemistry – an illustrated colour text. 3rd ed. Churchill Livingstone, 2004
5. Gilbert H.F. – Basic concepts in biochemistry; a student survival guide. 2sd ed. McGraw-Hill: Health Professions Division, 2000
6. Kaplan L.A., Pesce A.J. – Clinical Chemistry - theory, analysis, and correlation. 3rd ed. Mosby Co, 1996
7. Koolman J., Roehm K-H. – Color Atlas of Biochemistry. 2nd ed. Thieme Co, 2005
8. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell P.W. – Harper's Illustrated Biochemistry. 26th ed. McGraw-Hill: Health Professions Division, 2003
9. Swanson T. A., Kim S.I., Glucksman M.J. – Biochemistry and Molecular Bolology. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007
10. Terwecoren A, Steen E, Benoit D, Boon P, Hemelsoet D., Acta Neurol Belg. 109(3):181-8, 2009

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 10.
Proteine – structură, funcții și metabolism. Proteinele plasmatice

Minodora Dobreanu

Proteinele sunt macromolecule cu greutate moleculară cuprinsă între zeci de mii și mai multe milioane de daltoni, alcătuite din aminoacizi. În funcție de numărul aminoacizilor constituenți, polimerii se numesc peptide (di-, tri-, tetra-, penta-, oligo- și polipeptide). După forma particulelor, proteinele pot fi fibrilare, alungite sau globulare / sferice, cu lanț(uri) peptidic(e) răsucit(e) sub formă de ghem.

10.1 Structura proteinelor

Proteinele sunt alcătuite din aminoacizi *legați covalent* prin legături peptidice între grupările aminice ($-NH_2$) și carboxilice (-COOH) conținute de toți aminoacizii, dar și fizic prin *legături secundare*: de hidrogen, ionice, hidrofobe sau forțe van der Waals între radicalii hidrofili sau hidrofobi ai aminoacizilor. Din mulțimea aminoacizilor posibili, în proteine se găsesc 20 de aminoacizi naturali. Gruparea amino este localizată de obicei la atomul de carbon cel mai apropiat grupării carboxilice (numit Cα). Acești derivați sunt aminoacizi corespunzând formei L (levogire) a izomerilor optici.

Există patru **nivele de organizare** structurală a proteinelor:

I. *Structura primară* (secvență): este dată de numărul și succesiunea aminoacizilor legați covalent în lanțul proteic.

II. *Structura secundară*: se datorează orientării în spațiu a lanțului proteic sub forma unui α-helix sau foi β-pliate, determinată de atracția electrostatică între centrele de sarcină create prin distribuirea inegală a electronilor între atomii participanți la legăturile covalente peptidice situate în proximitate. Forțele fizice care determină această structură sunt legături de hidrogen realizate între atomii de oxigen și hidrogen implicați în legătura peptidică.

III. *Structura terțiară*: este asigurată de aranjamentul în spațiu al diferitelor regiuni cu structură secundară ale lanțului proteic, determinat de legăturile hidrofobe, ionice, prin forțe van der Waals sau prin legătură bisulfidică (-S-S-), realizate între radicalii aminoacizilor componenți situați la distanță unul de celălalt.

IV. *Structura cuaternară*: definește maniera de asociere prin legături necovalente, a două sau mai multe catene proteice.

10.1.1 Structura primară

Gruparea carboxilică (C-terminală) a unui aminoacid și cea aminică (N-terminală) a unui alt aminoacid pot reacționa (cu eliminarea unei molecule de apă), formând o legătură amidică numită legătură peptidică. Prin repetarea succesivă a acestei cuplări, se formează lanțuri cu diferite compoziții și lungimi, numite peptide, conținând câte o grupare aminică liberă (la capătul N-terminal) și una carboxilică (la capătul C-terminal). Tipul și secvența aminoacizilor constituenți dintr-un lanț peptidic formează structura primară. În mod convențional, numărătoarea aminoacizilor din cadrul unui peptid sau unei proteine, începe de la capătul N-terminal al moleculei. Lanțurile peptidelor, respectiv ale proteinelor,

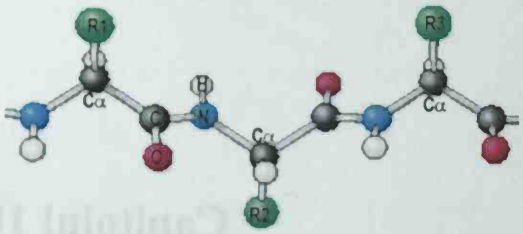


Figura 10.1. Schema structurii legăturii peptidice (atomii implicați sunt situați coplanar)

sunt de fapt structuri polimerice liniare. Deși între lanțurile individuale se pot forma variate legături secundare, lanțul peptidic însuși nu se poate ramifica.

Atomii participanți la formarea legăturii peptidice (-CO-NH-) se situează în același plan și formează axa principală a lanțului peptidic. Pe laturile acestei axe se situează catenele laterale ale aminoacizilor constituenți. Prin această așezare, aminoacizii constituenți determină într-o măsură substanțială proprietățile moleculelor peptidice sau proteice. Deși legătura chimică între atomii de carbon și de azot din cadrul legăturii peptidice reprezintă un cuplaj foarte rigid, totuși prin intermediul atomilor de carbon α, legătura peptidică însăși are o mobilitate mare în toate planurile, ceea ce conferă lanțului o flexibilitate considerabilă. Schema structurii lanțului peptidic este redată în *Figura 10.1.*

10.1.2 Structura secundară

Un rol determinant în realizarea structurilor secundare ale moleculelor proteice revine legăturilor de hidrogen realizate între atomii de oxigen și hidrogen legați covalent de atomii de carbon, respectiv de azot angajați în legătura peptidică, poziționați la distanță de-a lungul lanțului peptidic.

Proteinele se prezintă ca structuri tridimensionale, așezarea și orientarea în spațiu a întregii molecule proteice determinând conformația proteinei, dar și caracteristicile fizico-chimice și biologice. Structura secundară se obține prin orientarea ordonată în spațiu a lanțului polipetidic, datorată legăturilor de hidrogen realizate între atomii de hidrogen și oxigen conținuți în legăturile peptidice; această conformație se realizează în două forme structurale deosebite: spirala α și foaia β pliată (schemele spiralei α și foii β pliate sunt redate în *Figurile 10.2 a, b).*

- **Spirala α** este o structură răsucită într-o spirală strânsă, având axa interioară compactă, formată de secvența legăturilor peptidice și din care se desprind catenele laterale ale aminoacizilor constituenți. Spirala se rotește de la stânga spre dreapta, înălțimea unui segment este de 0,54 nm (5,4 Å), cuprinzând o medie de 3,6 molecule de aminoacizi pe fiecare spiră. Stabilitatea structurii spirale este determinată de formarea legăturilor de hidrogen între atomii de hidrogen și de oxigen din legăturile peptidice apropiate. În structurile proteice, lungimea acestor spirale nu depășește, de obicei, limita de 4 nm (40 Å). În schimb două sau mai multe α - spirale răsucite sub formă de cablu, pot forma fibre proteice deosebit de rezistente, elastice, uneori contractile.

- **Foaia pliată β** este o structură aproape plată, dispusă pe orizontală, în care unghiurile valențelor atomilor de carbon α cu planurile legăturilor peptidice, sunt obtuze. Punțile de hidrogen care fixează poziția lanțurilor paralele sunt așezate între legăturile peptidice situate la distanțe mari de-a lungul lanțului peptidic. Sensul plierii acestor lanțuri poate fi paralel sau antiparalel. Aceste două variante pot apare izolat sau simultan în structura majorității proteinelor.

10.1.3 Structurile terțiară și cuaternară

Orientarea în spațiu a tuturor structurilor secundare determină structura terțiară, iar așezarea de ansamblu a peptidelor constituente (monomeri), reprezintă structura cuaternară (doar la structurile proteice alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice). Conformația în spațiu a moleculelor proteice native se realizează prin legături secundare și uneori covalente (-S-S-), stabilite între diferitele porțiuni ale peptidului, situate la distanță de-a lungul lanțului peptidic (structura terțiară) sau prin legături secundare între lanțurile constituente (structura cuaternară). Printre aceste legături figurează forțele slabe (van der Waals), legăturile ionice (electrostatice) și legăturile apolare. Orice acțiune fizică (reacția mediului: temperaturi extreme, ultrasunete, radiații UV etc), chimică (acizi și baze tari, săruri ale metalelor grele) sau biologică (enzime), care duce la schimbarea conformației, produce și denaturarea proteinelor (schimbarea ireversibilă a proprietăților fizico-chimice și biologice). În unele condiții speciale conformația poate fi schimbată și fără denaturare: modificările alosterice presupun oscilarea conformației între două forme extreme: relaxată (R) și tensionată (T).

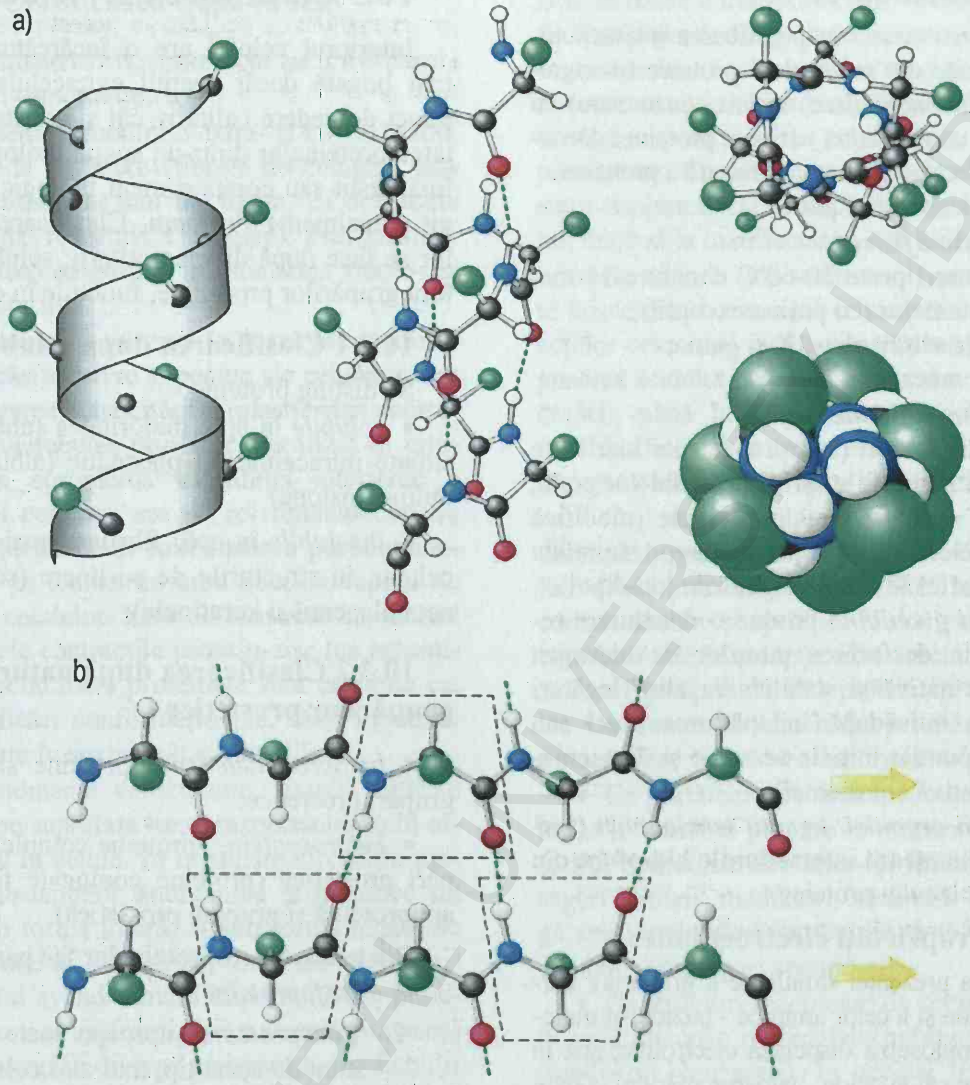


Figura 10.2 a) Modele structurale pentru spirala α și **b)** Structura în foaie pliată β a lanțului peptidic

10.2 Proprietățile generale ale proteinelor

Proprietățile fizico-chimice și biologice ale proteinelor sunt determinate de cele ale aminoacizilor constituenți. Masa moleculară a proteinelor poate fi determinată fie prin ultracentrifugare (Svedberg), fie prin filtrare în gel și poate varia între câteva zeci și mai multe mii de kDa. Proteinele pot fi separate și prin precipitare salină, cu ajutorul cromatografiei pe coloană, precum și prin electroforeză, pe baza vitezei diferite de migrare în câmp electric.

10.2.1 Solubilitatea

Solubilitatea în apă a proteinelor este influențată de repartizarea pe suprafața moleculei proteice a radicalilor aminoacizilor apolari, încărcați sau neîncărcați. Solubilitatea proteinelor este minimă la pH-ul izoelectric (pHi) - pH-ul la care sarcina electrică netă este nulă. Solubilitatea proteinelor depinde nu numai de **pH**-ul mediului, dar și de prezența unor **electroliți** (acizi, baze slabe, săruri ale metalelor ușoare: NaCl, $MgCl_2$, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$ în soluții diluate). Proteinele fibrilare sunt insolubile în apa pură și de asemenea insolubile în soluții saline diluate, iar proteinele globulare sunt greu solubile în apă pură și solubile în soluții saline diluate (fenomen denumit "*salting in*"). La concentrații crescute de sare are loc salifierea ("*salting out*"), adică scăderea solubilității proteinei prin deshidratare. Acest procedeu este utilizat pentru separarea albuminelor de globuline, deoarece albuminele precipită doar în soluții saturate de $(NH_4)_2SO_4$, iar globulinele în soluții semisaturate.

10.2.2 Denaturarea

Denaturarea constă în perturbarea interacțiunilor necovalente din moleculele proteice (dezagregarea structurii secundare, terțiare, cuaternare) cu modificarea conformației native a proteinei. Denaturarea nu afectează structura primară a proteinei.

Agenții denaturanți pot fi:

- ***de natură fizică:***

- temperaturi peste 50-60°C denaturează majoritatea proteinelor (cu puține excepții);
- radiațiile ultraviolete, X și gama;
- agitația mecanică.

- ***de natură chimică:***

- *pH-uri extreme* (soluții de acizi sau baze tari) precum și soluțiile sărurilor metalelor grele, denaturează aproape toate proteinele (modifică încărcătura electrică a grupărilor de pe suprafața moleculei, astfel se desfac legăturile ion-dipol).
- *ureea și guanidina* produc o denaturare reversibilă prin desfacerea punților de hidrogen din proteina nativă și stabilizarea altor legături de hidrogen noi (după îndepărtarea ureei sau guanidinei, punțile inițiale se refac și de asemenea forma nativă a proteinei).
- *solvenții organici, agenții tensioactivi* (surfactanți) influențează interacțiunile hidrofobe din interiorul moleculei proteice.

10.2.3 Proprietăți electrochimice

Din cauza prezenței simultane a grupărilor carboxilice - acide și a celor aminice - bazice, în moleculele lor, aminoacizii disociază electrolitic, atât în medii alcaline cât și acide. Valoarea pH-ului la care ambele grupări (aminică și carboxilică) sunt ionizate, reprezintă pH-ul izoelectric al aminoacizilor. Proteinele sunt macromolecule încărcate (amfoliți macromoleculari) cu sarcina electrică netă egală cu suma algebrică a tuturor sarcinilor de pe suprafață, influențată de pH-ul mediului în care se găsește. pH-ul izoelectric al proteinelor solubile în apă (pHi) este acea valoare a pH-ului la care sarcina globală netă a macromoleculei este nulă. În funcție de pH, proteinele pot exista sub trei forme electrice: forma cationică (NH_3^+-P-COOH) la pH < pHi, amfiionică (NH_3^+-P-COO^-) la pH = pHi și anionică (NH_2-P-COO^-) la pH > pHi. La pH fiziologic majoritatea radicalilor sunt ionizați (histidina este ionizată în proporție de ~50%). Cu cât pH-ul mediului este mai îndepărtat de pHi, sarcina proteinei este mai mare. Proprietatea de a migra în câmp electric este utilizată în separarea proteinelor prin electroforeză, realizată în mediu alcalin (*vezi Capitolul 11*).

10.3 Clasificarea proteinelor

Interiorul celulei are o încărcătură proteică mai bogată decât spațiul extracelular, atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ. Totalitatea proteinelor dintr-un spațiu biologic dat (celulă, țesut sau compartiment biologic) este definit actualmente ***Proteom***. Clasificarea proteinelor se face după diverse criterii: solubilitate, natura grupărilor prostetice, funcțiile în organism.

10.3.1 Clasificarea după solubilitate

Se disting proteine:

- *solubile* în apă: majoritatea sunt globulare, situate intracelular și plasmatic (albumine, globuline, histone)
- *insolubile* în apă: fibrilare, mai ales extracelular, în structurile de susținere (scleroproteine: colagenul și keratinele).

10.3.2 Clasificarea după natura grupărilor prostetice

- *holoproteinele* sunt proteine simple, fără grupări prostetice;
- *heteroproteine*, proteine complexe, cu grupări prostetice (proteine conjugate formate din apoproteină și grupare prostetică).

Din grupa heteroproteinelor fac parte:

1. *fosfoproteine*;
2. *glicoproteine:* aproape toate proteinele sunt de acest tip, mai ales cele din membrane și cavități;
3. *lipoproteine*: sunt formate din apolipoproteină și lipide legate necovalent;
4. *cromoproteine*: conțin grupare prostetică colorată în roșu (în cazul hemoproteinelor: hemoglobina, mioglobina, citocromii – transportori de electroni) sau în galben (în cazul flavoproteinelor cum ar fi cele cuplate cu vitamina B_2 - riboflavină - transportor de protoni);
5. *metaloproteine* (feritina, ceruloplasmina, anhidraza carbonică);
6. *nucleoproteine* (proteinele bazice –histone - legate de acizii nucleici prin legături saline);
7. proteinele formate prin conjugarea mai multor grupe prostetice cum ar fi *fosfoglicoproteinele*.

10.3.3 Clasificarea după funcții

În organismele vii, proteinele au următoarele **funcții** mai importante:

• Elemente structurale extra- și intracelulare, cu funcții de susținere (fibrele de colagen, respectiv de tubulină) sau de fixare, ca adezinele (fibronectina, respectiv clatrinele). Prin elasticitate (elastina) asigură și plasticitatea micro- și macrostructurilor.

• Ca elemente contractile, joacă roluri multiple în mișcările active și pasive ale celulelor, dar și în asigurarea elasticității și plasticității acestora. Sistemul tubular proteinic, localizat în citoplasmă, în apropierea suprafeței interioare a membranei celulare, are un rol fundamental nu numai în formarea și funcționarea pseudopodelor, dar și în realizarea modificărilor rapide de formă ale celulelor. Este de remarcat că, alături de proteinele contractile propriu-zise (ca actomiozina), practic toate proteinele sunt capabile ca, prin modificări conformaționale, să-și modifice atât structura în spațiu, cât și funcțiile.

• Ca elemente vehiculante, fixează diferite substanțe pe suprafața lor, transportându-le în organism sau în celule. În organism circulația majorității substanțelor anorganice și organice nu are loc sub formă liberă, ci sub formă legată de diferite proteine (albumine, fracțiuni globulinice), aspectul având o mare importanță din punctul de vedere al uniformizării concentrației acestor constituenți în diverse compartimente lichidiene: din cauza diferențelor mari de concentrație între spațiul vascular și lichidul interstițial sau între lichidul interstițial și spațiul intracelular, schimburile componenților dizolvați s-ar desfășura foarte rapid, ceea ce ar fi deosebit de dezavantajos din punct de vedere metabolic: pe de o parte cantitățile lor ar oscila între valorile maxime și zero, iar pe de alta celulele nu ar fi în stare să prelucreze cantitățile excesive de nutrienți cu un randament corespunzător. În schimb, substanțele fixate de proteine, se pot deplasa dintr-un compartiment (plasmă, lichid tisular) în altul (lichidul interstițial, citoplasmă) numai dacă în aceasta se găsește, în cantitate suficientă, un alt vehicul (receptor) care dispune de suprafețe de transport disponibile pentru preluarea substanței sau substanțelor vehiculate de transportor. Schimburile de substanțe de acest gen, se desfășoară cu viteze substanțial mai mici, decât cele prin difuziune simplă. În urma saturației capacității de fixare a transportorului, rămâne și substanță liberă, producând uneori daune considerabile organismului, ca în cazul icterului patologic al nou născutului - bilirubina formată în exces, saturează capacitatea de transport a albuminelor plasmatice. Componenta liberă se depune în țesutul conjunctiv și în nucleii de la baza creierului, ducând la manifestarea icterului nuclear.

• Ca enzime (biocatalizatorii), participă la toate fazele metabolismului celular, de la cataliza reacțiilor celor mai simple (ca formarea și descompunerea acidului carbonic, sub acțiunea carboanhidrazei), până la biosinteza materialului genetic (ADN). Biocataliza reprezintă una dintre cele mai importante funcții biologice ale proteinelor.

• Ca imunoglobuline (anticorpi), fac parte din sistemul de apărare umorală specifică a organismului. Prin intermediul porțiunilor lor structurale complementare și specifice (Fab - paratopii), anticorpii pot fixa în mod specific structurile corespunzătoare (epitopii) ale altor proteine proprii sau străine. Ca urmare, proteinele fac parte din grupa mare a structurilor receptoare din organism.

• Ca purtătoare de semnale, cuprind în structurile lor mesaje pe care le transmit celulelor în cadrul comunicărilor inter- și intracelulare (mesageri primari, mediatori, hormoni) sau le propagă spre enzimele / structurile țintă, în interiorul celulelor (mesageri secundari).

• Ca structuri receptoare de semnale, pot fixa în mod specific moleculele mesagerilor primari (mediatori, hormoni). În același timp, propagă spre interiorul celulei mesajul recepționat, prin declanșarea formării / eliberării mesagerilor secunzi (cAMP, cGMP, Ca^{2+}, inozitoltrifosfat-IP_3, diacil glicerol-DAG, monoxid de azot-NO).

• Ca structuri determinante individuale (markeri), sub forma unor molecule glicoproteice specifice localizate pe partea externă a membranelor celulelor (antigenele de histocompatibilitate, HLA, MHC), exprimă identitatea tuturor structurilor proprii celulare ale unui individ.

10.4 Proteinele plasmatice

O proteină este considerată ca aparținând plasmei dacă are concentrație mai mare în spațiul plasmatic decât extravascular și dacă își desfășoară principala funcție în plasmă. Plasma sanguină conține câteva sute de specii proteice, în concentrație totală de 60-80 g/l, ceea ce corespunde unei cantități de 150-250 g proteine circulante. Câteva sute de specii proteice plasmatice

au fost izolate și caracterizate structural și funcțional, fiind extrem de heterogene și cu concentrații individuale variind pe o plajă de 6 puteri ale lui zece (de ex. albumina: 40 g/L, IgE 40 μg/L). Greutatea lor moleculară variază de la câteva zeci de mii (alfa 1 globulinele) la mai multe sute de mii de daltoni (macroglobulinele).

Cu câteva excepții, marea majoritate a proteinelor sunt sintetizate în hepatocite. Din cauza scăderii biosintezei, pierderii sau degradării excesive a proteinelor plasmatice, apar hipoproteinemiile, în schimb, creșterea sintezei produce hiperproteinemie. Capacitatea maximă de transport a celulelor tubulare renale pentru proteinele filtrate glomerular, este limitată; la valori ale proteinemiei de peste 100 g/l, din cantitatea filtrată a proteinelor cu greutate moleculară mică se reabsorbe numai o parte, restul eliminându-se prin urină (proteinurie prerenală).

Pentru determinarea / fracționarea proteinelor din plasmă se utilizează mai multe metode: precipitarea salină a albuminelor și globulinelor, ultracentrifugarea, electroforeza liberă și în zonă, cromatografia pe coloană, tehnicile imunologice etc.

10.4.1 Funcțiile biologice ale proteinelor plasmatice

- Cantitatea circulantă a proteinelor reprezintă o importantă rezervă proteică / aminoacidică pentru organism.
- Prin concentrația mai mare în plasmă decât în lichidul interstițial, proteinele asigură presiunea coloid-osmotică plasmatică, responsabilă de desfășurarea normală a schimburilor de apă și de substanțe dizolvate între plasmă și țesuturi.
- Alături de elementele circulante celulare, prin forma reologică optimă a moleculelor lor (globuloasă), proteinele plasmatice asigură o vâscozitate minimă posibilă a sângelui.
- Pe suprafața lor moleculară fixează o serie de substanțe micromoleculare organice și anorganice, pentru care îndeplinesc funcția de vehicul nespecific și/sau specific în sânge.
- Proteine / enzime cu importante roluri biologice chiar în circulația sanguină (enzime proprii ale plasmei), sunt LPL, LCAT, factorii de coagulare, inclusiv factorii sistemului properdinic și de complement. O parte a enzimelor din celulele unor organe și țesuturi ajung (în condiții fiziologice) în plasmă numai în cantități minime. Astfel, creșterea activității lor plasmatice reprezintă un bun indicator al afectării / lizei țesuturilor și organelor de origine (LDH, GOT, GPT etc). O formă deosebită a proteinelor plasmatice biologic active o constituie antiproteazele cu acțiune anticoagulantă, dar și antiinflamatoare.
- O cantitate însemnată (10-15 g/L) din totalul proteinelor plasmei o reprezintă imunoglobulinele, cu funcții importante în apărarea umorală specifică a organismului.
- Ca molecule amfoterice, proteinele au o oarecare capacitate de tamponare (5-10% din capacitatea de tamponare sanguină): deși într-o mai mică măsură, contribuie totuși la echilibrul acido-bazic.

10.4.2 Metabolismul proteinelor plasmatice

Concentrația proteinelor plasmatice este un parametru dinamic, determinat de trei factori principali: rata de sinteză, rata de eliminare (prin catabolism sau pierderi externe) și volumul de distribuție între spațiul intravascular și extravascular (inclusiv pierderile în lichidele de ascită și exudate).

10.4.2.1 Sinteza

Fiecare celulă își sintetizează propriile proteine (enzime, receptori, MHC, transportori etc). Cele mai multe proteine plasmatice sunt sintetizate în ***hepatocite*** (albumina, factori de coagulare, unele apoproteine, globuline), dar există și proteine plasmatice sintetizate în ***limfocite*** (limfocitele B transformate secretor secretă imunoglobuline), ***celule endoteliale*** (factori de coagulare și fibrinoliză, molecule de adeziune celulară), ***enterocite*** (apoproteine), ***macrofage*** (citokine, factori de complement și inhibitori de proteaze), ***adipocite*** (secretă factorul properdinic D - esențial în activarea sistemului complementului pe calea alternativă). Zilnic se sintetizează și se degradează aproximativ 25 g de proteine plasmatice. Nu există depozite intracelulare de proteine, cu excepția celulelor glandulare producătoare de hormoni de natură proteică.

Mecanismul general de sinteză al proteinelor este comun tuturor celulelor și implică interacțiuni multiple între ADN genomic și ARN mesager, migrarea ARN mesager în citoplasmă unde, la nivelul ribozomilor, are loc translația informației din ARNm - sinteza proteinelor. În timp ce proteinele intracelulare sunt sintetizate și de ribozomi citoplasmatici / liberi, proteinele plasmatice (dar și acelea lizozomale și membranare) sunt

sintetizate în poliribozomi legați în/de membranele reticulului endoplasmic rugos, în interiorul căruia sunt apoi stocate temporar. Pentru a deveni funcționale proteinele necesită apoi *modificări post-translaționale* în membranele reticulului endoplasmatic sau ale aparatului Golgi, constând în carboxilări, glicozilări, lipidări, formarea legăturilor disulfidice, plierea lanțului, formarea legăturilor secundare, terțiare, cuaternare. Ulterior trec în aparatul Golgi în care se formează granule secretorii. Cele mai multe glicozilări se fac la reziduurile de asparagină (carbohidrați N-legați), excepții fiind alfa-1-glicoproteina acidă și C1 INH, la care resturile glucidice se leagă la resturi de serină sau treonină (carbohidrați O-legați). Sinteza propriu-zisă a lanțului polipeptidic nu durează mai mult de 1-2 minute, fenomenele de procesare post-translațională prelungesc însă, cu 20-40 minute, secreția proteinelor. După modificările post-translaționale, proteinele sunt transportate prin vezicule secretorii, care se desprind din membranele aparatului Golgi și se contopesc/ fuzionează cu membrana celulară, proteinele fiind exocitate în spațiul extracelular. Dacă proteinele nu corespund calitativ, vor fi degradate în citosol.

Reglarea sintezei depinde de:

- existența și calitatea materiei prime (în primul rând a aminoacizilor), statusul nutrițional fiind vital;
- factori genetici (deficite, polimorfism genic)
- inducerea / represia genică sub acțiunea unor hormoni (corticosteroizii, androgenii, tiroxina – au efect stimulator, iar estrogenii – inhibitor asupra sintezei albuminei și a altor transportori specifici);
- existența unor factori toxici (de exemplu alcoolul: inhibă sinteza proteinelor la nivel hepatic);
- scăderea presiunii coloid-osmotice plasmatice este un stimul important pentru accelerarea sintezei proteinelor și lipoproteinelor în ficat;
- produșii de degradare ai fibrinogenului și protrombinei stimulează sinteza respectivelor proteine în ficat.
- Citokinele: IL-1 și IL-6 sunt factori de stimulare hepatică a sintezei reactanților de fază acută (prin inducerea transcripției genice a unor proteine plasmatice, ca proteina C reactivă, haptoglobina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteina acidă etc), TNF-α are efect citotoxic asupra celulelor tumorale, IFN-γ are efecte antivirale. Sinteza citokinelor are loc ca răspuns la stimuli extracelulari, sunt reglate de corticoizi și se degradează rapid după dispariția semnalelor care le-au determinat sinteza.

10.4.2.2 Distribuția

Aproximativ 250 g proteine (70 g/l) se găsesc în compartimentul vascular. Lichidul interstițial/ extravascular conține în jur de 350 g proteine. Concentrația în proteine a plasmei sau a lichidului interstițial depinde de mișcarea liberă a apei din spațiul vascular în interstițiu și invers, dar și a unor proteine care trec permanent prin spațiile intercelulare sau traversează celule endoteliale prin vezicule de pinocitoză. Produsul acestei "cerneri moleculare" se numește transudat: conține < 30 g/L proteine.

Un aspect particular îl reprezintă trecerea proteinelor prin filtrul glomerular și prin bariera hemato-encefalică (BHE).

În funcție de dimensiunea și sarcina de suprafață, proteinele pot ajunge în cantitate limitată (< 0,15 g/24h) și în urină. În urina persoanelor sănătoase pot fi prezente: albumina, α-1-microglobulina, IgG, α-1-glicoproteina acidă, α-1-antitripsina, transferina, RBP, β-2-microglobulina, lizozim, cistatină C. Factorii care influențează proprietățile electrostatice și/sau structurale ale membranei bazale glomerulare (afecțiuni inflamatorii renale, de exemplu) pot crește eliminarea zilnică de proteine prin urină. ***Proteinuria*** poate fi de asemenea de origine pre- sau postrenală (*vezi și 20.4.4*), frecvența relativă a tipurilor de proteinurie fiind:

Renală > Post renală > Prerenală.

Proteinorahia – conținutul total de proteine în LCR, este considerabil mai mic decât al plasmei (aproximativ 0,5% din acesta – maximum 0,4 g/l). Compoziția relativă în proteine a LCR este aproximativ similară cu cea serică, cu excepția faptului că prealbumina este mai bine exprimată, în timp ce imunoglobulinele se găsesc în proporție mai mică. Peste 80% din proteinele prezente în mod normal în LCR, provin din plasmă (prin transport pasiv), restul fiind produse local, în sistemul nervos central. Raportul QAlb = $[Alb]_{LCR\ mg/l}$ / $[Alb]_{ser\ mg/l}$, este utilizat pentru a determina perturbări ale permeabilității BHE. Valori până la 10×10^{-3} pot fi întâlnite în scleroza multiplă, encefalita cronică din infecția HIV, polineuropatia alcoolică, herpes zoster.

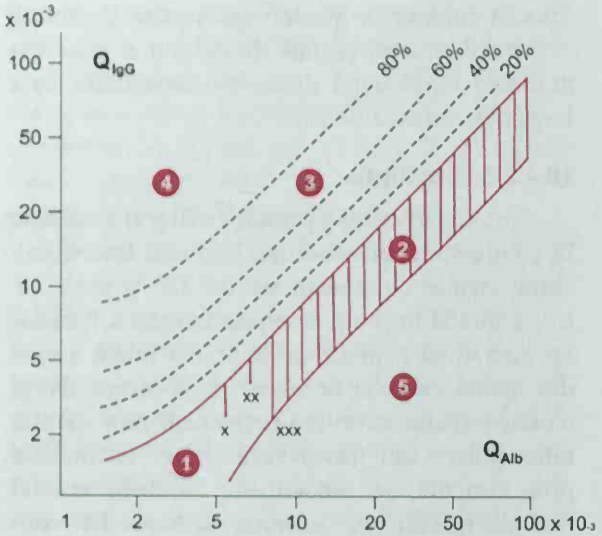


Figura 10.3. Diagrama Reiber – Felgenhauer pentru diferențierea transferului proteic fiziologic prin BHE, de răspunsul umoral local (1 – domeniul de referință: x – grupa de vârstă < 15 ani; xx pentru 15 – 40 ani; xxx pentru 41-60 ani; 2 – perturbări ale transferului prin BHE, fără sinteză locală de IgG; 3 - perturbări ale transferului prin BHE, cu sinteză adițională de IgG; 4 – sinteză locală de IgG, fără perturbări ale transferului prin BHE; 5 – fără semnificație clinică).

Valori între 10-20x10^{-3} pot fi întâlnite în meningite virale, meningoencefalopatii cu germeni oportuniști, polineuropatia diabetică, infarct cerebral, atrofia cerebrală.

Valori mai mari de 20 x 10^{-3} pot apare în sindromul Guillain-Barré, encefalitele cu virus herpes simplex, bacteriene, în special cu bacil Koch.

Un alt indice util în diagnostic este indicele Delpech – Lichtblau: = $[IgG]_{LCR}$x$[Alb]_{ser}$ / $[IgG]_{ser}$ x $[Alb]_{LCR}$, în mod normal fiind < 0,7. Creșterea acestui indice indică producție de IgG intratecal.

Tulburări ale permeabilității BHE pot fi evidențiate cu ajutorul diagramelor Reiber și Felgenhauer (*Figura 10.3*). Raportul concentrațiilor imunoglobulinelor (Ig G, A, M) și albuminei între LCR și ser, sunt utilizate pentru diferențierea transportului pasiv de răspunsul imun umoral al SNC.

Diagrama Reiber (*Figura. 10.3)* redă într-un sistem de coordonate Q Ig față de Q Alb, unde:

$QIg=[IgG+IgA+IgM]_{LCR}/[IgG+IgA+IgM]_{ser}$,

$QAlb=[Alb]_{LCR}$ / $[Alb]_{ser}$.

Tabelul 10.I. Timpul de înjumătățire al unor proteine plasmatice

Proteina	$t_{1/2}$
Albumina	19-21 zile
α_1-antitripsina	4 zile
Complement C3	0,5 – 1 zi
Complement C4	0,5 – 1 zi
Ceruloplasmina	4 – 10 zile
PCR	12 – 24 ore
Feritina	10 minute
α_1- fetoproteina	4 zile
Fibrinogen	3 zile
Haptoglobina	2 – 4 zile
Ig A	6- 8 zile
Ig G	17 - 35 zile
Ig M	5 - 7 zile
Ig D	3 zile
Ig E	2 zile
Receptorul solubil al transferinei	10 zile
α_2 - Macroglobulina	4 - 7 zile
β_2 - microglobulina	40 minute
Mioglobina	15 minute
Prealbumina	1 – 2 zile
Procalcitonina	24 – 30 ore
α_1- glicoproteina acidă	5 - 6 zile
Transferina	7 – 10 zile

Valori sub domeniul de referință denotă un transfer pasiv prin BHE, în timp ce valori superioare intervalului fiziologic indică sinteză locală (la nivelul SNC) de imunoglobuline. Diagrama nu poate fi utilizată dacă LCR conține mai mult de 10^6 hematii/L.

10.4.2.3 Catabolismul / Eliminarea

Majoritatea proteinelor sunt degradate de propriile celule conform unui turn-over propriu sau imediat după sinteză, datorită unor imperfecțiuni structurale. Aminoacizii sunt eliberați în lizozomi (proteoliză), trec în fondul comun citoplasmatic, unde o parte sunt utilizați pentru resinteză proteică, iar alții sunt degradați chimic (prin dezaminare, decarboxilare). Localizări importante din punctul de vedere al ratei de catabolizare sunt: tractul gastrointestinal (proteinele alimentare sunt degradate sub acțiunea proteazelor), ficatul și tubii contorți proximali renali.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.II. Clasificarea proteinelor plasmatice după caracteristicile fizico-chimice ale acestora

Funcții	Denumire	Migrarea EF	GM (kDa)	Concentrația
I. Transportori	**Nespecifici**			
	Albumina	Albumină	68	35-45 g/L
	Specifici			
	Prealbumina	Prealbumină	55	0,2-0,3 g/L
	RBP (retinol binding protein)	α_1-globulină	21	2 – 6 mg/dL
	Transcortina	α_1-globulină	56	4-8 mg/dL
	Transferina	β-globulină	77-88	2-4 g/L
	Transcobalamina	α_1-globulină		0,1 – 0,5 mg/dL
	Haptoglobina	α_2-globulină	85	2,5 – 4,5 g/L
	TBG (tiroxin binding globulin)	α_1-globulină	61	1 – 3 mg/dL
	ApoA	α_1-globuline	20-40	1,2 – 2,5 g/L
	ApoB	α_2-globuline	514	0,8 -1,5 g/L
II. Apărare	**Specifică**			
	Ig G	γ 1,2,3-globuline	130	6-16 g/L
	Ig A	γ1,2-globuline	140 - 420	0,7-4 g/L
	Ig M	γ1-globuline	900	0,4-2 g/L
	Nespecifică			
	Factorii coagulării	α, β-globuline	variabilă	4-5 g/L
	PCR (proteina C reactivă)	γ-globulină	140	0,3 mg/dL
	C3	β-globulină	180	0,8-1,2 g/L
	Inhibitori de Proteaze cu serina în centrul activ (SERPIN-ice)			
	α_1-antitripsina	α_1-globulină	54	2-3,8 g/L
	α_1-antichimotripsina	α_1-globulină	68	0,35-0,55 g/L
	α_2-antiplasmina	α_2-globulină	70	4-8 mg/dL
	Antitrombina III	α_2-globulină	65	0,2-0,4 g/L
	PC Inh	α_2-globulină	57	0,3-0,6 mg/dL
	C1 Inh	α_1-globulină	104	0,2-0,3 g/L
	PAI (Inhibitorul activatorului plasminogenului)		50	1-3 µg/dL
	Inhibitori de Proteaze ne-SERPIN-ice			
	α_2-macroglobulina	α_2-globulină	820	2,5-4 g/L
III. Hormoni proteici și enzime plasmatice	Insulina			
	Renina			
	α-Amilaza			
	Lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT)			
	Lipoproteinlipaza (LPL)			
	Colinesteraza (CHE)			
IV. Funcție controversată	α_1-glicoproteina acidă	α_1-globuline	44	0,6-1 g/L
	Ceruloplasmina	α_2-globulină	132	0,3-0,4 g/L
	β_2-microglobulina	β_2-globuline	11,8	0,2 mg/dL

Traversând filtrul glomerular, proteinele cu moleculă mică (de ex. lanțuri ușoare libere, β2 microglobulina) ajung în urina primară, de unde în mod normal sunt reabsorbite și dezintegrate de către celulele tubulare renale. În cazul creșterii concentrației plasmatice a acestor proteine, procesul de reabsorbție renală poate fi depășit (proteinurie prerenală – *vezi 20.4.4*). Rata de degradare a proteinelor plasmatice este descrisă de timpul de înjumătățire (*Tabel 10.I*), acest parametru având importanță specială în analiza markerilor tumorali (*vezi 19.1*).

BCU IASI CENTRALA UMF STR LIBRARY

10.4.3 Caracteristicile principalelor proteine plasmatice

Proteinele plasmatice sunt mai des studiate în scop diagnostic, comparativ cu alte proteine din organism. Marea majoritate sunt glicoproteine (cu un conținut variabil de carbohidrați: 10-25%), cu excepția albuminelor, amilazei-α, proteinei C reactive (PCR), β2 microglobulinei (și a altor câteva mai puțin analizate), care sunt alcătuite exclusiv din aminoacizi. *Tabelul 10.II* conține clasificarea principalelor proteine plasmatice, după funcția și caracteristicile fizice ale acestora.

10.4.4 Proteine transportoare

10.4.4.1 Albuminele

Plasma umană conține 35-45 g/L (0,5-0,8 mmol/L) albumine. Moleculele de albumină au forma globulară și sunt alcătuite dintr-un singur lanț peptidic pliat de mai multe ori, conținând 580 aminoacizi. În poziția N-terminală se găsește acid aspartic, în cea C-terminală-leucina. În structura peptidică se repetă secvențe hidrofile și hidrofobe la nivelul cărora se pot fixa ioni (Cu^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}), acizi grași, coloranți, bilirubină, medicamente, hormoni etc. Albuminele au o importantă funcție de transportor plasmatic nespecific. În contrast cu celelalte metale vehiculate în plasmă de proteine transportoare specifice, zincul plasmatic este fixat lax de albumine și de unii aminoacizi (histidina, cisteina), iar mult mai puternic de moleculele α2-macroglobulinei, ale lactat-dehidrogenazei și fosfatazei alcaline.

O moleculă de albumină conține 10 locusuri de legare pentru substanțele transportate, din care în mod normal sunt ocupate, în medie, doar 7. În condiții fiziologice la concentrația normală a AGL în plasmă, această capacitate de fixare a albuminelor este folosită numai într-o proporție de 8-10%. În urma unei lipolize excesive (de ex. în cursul unei inflamații grave), cantitatea AGL în plasmă poate fi atât de crescută, încât saturează întreaga capacitate de fixare a unor molecule de albumine bogate în triptofan, care fixează și tironinele. Încărcarea electronegativă puternică a AGL, va duce și la creșterea electronegativității moleculelor fixatoare, ducând la creșterea mobilității lor electroforetice și la apariția fracțiunii prealbuminice în proteinogramă. Capacitatea de fixare a albuminelor este competitivă și saturabilă. Astfel, în caz de icter neonatal, bilirubina fixată anterior poate fi eliberată de pe suprafața albuminelor de către unele antibiotice administrate în scop terapeutic la nou-născut, fixându-se cu o afinitate mai mare pe aceleași locusuri. Albuminele din plasmă se formează exclusiv în hepatocite și nu conțin glucide legate covalent. Sinteza hepatică de albumină este de aproximativ 20 g/zi, dar poate fi triplată la nevoie. Catabolizarea are loc în toate țesuturile, mai ales în țesutul hepatic, renal sau în tractul gastro-intestinal. Timpul lor de înjumătățire plasmatică este de 15-25 de zile.

Reglarea sintezei:

- *scăderea presiunii oncotice* a plasmei este stimul pentru accelerarea sintezei hepatice.
- *hormonii* tiroidieni și glucocorticoizi stimulează metabolismul albuminei plasmatice.

Patologie:

- *hiperalbuminemia* este o entitate patologică rară, se datorează cel mai frecvent deshidratării.
- *analbuminemia* este o boală genetică foarte rară, transmisă autosomal recesiv. Clinic se manifestă doar la homozigoți prin edeme maleolare, hipotensiune, steatoree.
- *hipoalbuminemia* este o scădere a concentrației plasmatice a albuminei sub 30 g/l (sub valoarea de 15 g/l prognosticul este rezervat). Scăderea poate fi datorită scăderii sintezei hepatice, sau poate fi consecința unor pierderi mai importante la nivel renal sau intestinal.

Cauzele hipoalbuminemiei pot fi grupate în trei categorii:

1. *fiziologic:* apare în timpul sarcinii și în clinostatism prelungit (datorită creșterii volumului de distribuție). Cantități mici de albumină străbat filtrul glomerular chiar în lipsa unei patologii renale (mai puțin decât ar fi de așteptat cunoscând diametrul moleculei albuminei - 7 nm, similar cu al porilor filtrului glomerular - datorită încărcăturii electrice negative atât a albuminei, cât și a endoteliului glomerular). Proteinuria fiziologică nu depășește însă 100-150 mg/zi. Albuminuria fiziologică nu depășește în mod obișnuit 10-20 mg/zi.
2. *artefactual*: prin diluție;
3. *patologic:*

a. *digestiv:* scăderea cantității de aminoacizi disponibili duce la scăderea sintezei albuminei în malnutriție, malabsorbție, enteropatie exudativă.

b. *hepatic*: în afecțiunile hepatice cu distrugerea parenchimului, hipoalbuminemia apare relativ târziu (când mai mult de 70-80% din țesutul hepatic este lipsit de funcție), deoarece parenchimul sănătos are o mare capacitate de amplificare a sintezei.

c. *renal*: afecțiunile renale (glomerulare, tubulare) duc la pierderi de proteine prin urină. Proteinuriile pot fi selective (se pierd doar albumine și o parte din globulinele de dimensiune mică) sau neselective. În sindroamele nefrotice pierderea de proteine urinare depășește 3 g / 24 ore. Hipoalbuminemia de cauză renală sau intestinală se instalează doar când pierderile de albumină depășesc capacitatea de sinteză hepatică compensatorie.

d. *prin creșterea permeabilității vasculare*: fenomenul are caracter acut și este datorat cel mai adesea activării sistemului complementului, a sistemului fibrinolitic, activării plachetare sau hipoxiei endoteliale. Are ca și principală consecință trecerea proteinelor din spațiul vascular în interstițiu, cele mai elocvente exemple fiind exudatele din șocul septic sau arsurile tegumentare extinse.

e. *prin hipercatabolism endogen*: la pacienții cu diverse patologii maligne în stadii terminale, apare o combinație de status hipercatabolic cu reacție de fază acută; celulele maligne preiau albumina ca și sursă de aminoacizi.

Examinări de laborator:

- *VSH* (viteza de sedimentare a hematiilor) crește;
- teste pozitive de *disproteinemie* (scade raportul albumine/globuline);
- scade concentrația de albumine;
- crește timpul de înjumătățire al albuminei plasmatice până la 50 zile;
- concentrația globulinelor crește;
- pe proteinogramă se modifică raportul între fracțiuni.

Clinic se constată edeme periferice (la concentrații de albumină sub 20 g/l), evitabile prin creșterea concentrației globulinelor. Hipoalbuminemii mai mult sau mai puțin accentuate apar, aproape fără excepție, în toate stările patologice cunoscute, din cauza consumului sporit (secreție, excreție) sau a formării insuficiente (hepatopatii).

10.4.4.2 Transferina

Din cantitatea totală a fierului din organism (3-5 g), plasma conține 15-25 μmol/L (100-130 μg/dL), sub formă legată de o glicoproteină numită transferină sau siderofilină. Sintetizată în hepatocite, dar în cantități reduse și în splină, în ganglionii limfatici și în celulele epiteliale ale mucoasei intestinale, transferina are rolul de a transporta fierul absorbit din intestin și de la locul de degradare al hemoglobinei spre locurile de depozitare și sinteză a hemoglobinei. Conținutul normal în transferină al plasmei este de 60 μmol/L (2-4 g/L). Transferina este o glicoproteină cu mobilitatea electroforetică a β1-globulinelor, formată dintr-un singur lanț peptidic cu masa moleculară de 80 kDa, cu mai multe forme alotipice. Fiecare moleculă de transferină are două subunități glucidice fixatoare de fier trivalent (Fe^{3+}). Glicoproteina conținând un ion de fier este semisaturată, iar cu 2 ioni de fier este total saturată. În condiții fiziologice, doar 30% din locusurile de legare de pe transferină sunt saturate. Coeficientul de saturație se calculează din raportul sideremiei și a capacității totale de fixare a fierului. Celulele consumatoare (eritroblaști, hepatocite, macrofage) preiau fierul transportat de transferină în urma fixării acesteia pe structurile receptoare specifice. Internalizarea Fe^{3+} legat de transferină se face prin intermediul receptorului membranar pentru transferină. În veziculele de endocitoză, pH-ul scăzut la 5,5 (realizat cu ajutorul unei pompe de H^+, ATP-dependente) favorizează eliberarea fierului și reducerea acestuia. Transferina și receptorul său se întorc pe suprafața celulei reluând ciclul de endocitoză. Transferina este și un factor de creștere pentru celule. Receptorul celular al transferinei (CD71) este o proteină de activare localizată pe suprafața celulelor care, pentru a prolifera, au nevoie de fier. Cantitatea de receptori pe suprafața celulelor, dar și componenta solubilă eliberată în plasmă (sTfR), este proporțională cu deficitul de fier al celulei purtătoare (excepție: în sarcină, afecțiuni maligne, procesele inflamatorii cronice – probabil IL-1 eliberată inhibă sinteza receptorilor de transferină). Cea mai mare încărcătură de receptori pentru transferină (80% din total) se găsește pe suprafața seriei eritroide de maturare medulară – eritroblastul policromatofil conține cea mai mare concentrație. Creșterea concentrației serice a sTfR apare în toate patologiile însoțite de intensificarea eritropoezei (crește necesarul de fier medular).

În cursul inflamațiilor, macrofagele activate înglobează cantități însemnate de fier plasmatic, împreună cu transferina. Această formă a hiposideremiei (deficit funcțional al fierului) poate fi totuși ușor deosebită de hiposideremia cauzată de o carență reală de fier. În cursul inflamațiilor cantitatea fierului seric scade paralel cu cantitatea transferinei, pe când în anemiile feriprive concomitent cu scăderea sideremiei apare o creștere marcată a cantității transferinei și mai ales a sTfR. În infecțiile cronice însoțite de o carență reală de fier, dozarea concomitentă a feritinei clarifică starea depozitelor de fier.

10.4.4.3 Feritina

Este cunoscută ca metaloproteină de depozit a fierului în organism (fiecare moleculă poate stoca până la 4.500 ioni Fe^{2+}). Proteina (apoferitina) este alcătuită din 24 subunități bazice (forma -L) sau acide (forma - H), cu greutatea moleculară de 450 kDa. Izoferitinele acide se găsesc în miocard, iar cele bazice - în țesuturile axate pe stocarea fierului (hepatic, splenic, sideroblaștii medulari); rinichiul conține izoferitină cu ambele tipuri de subunități. Prin supraîncărcarea cu fier a feritinei, aceasta se transformă în hemosiderină (proteină denaturată în mare parte – datorită încărcăturii ferice deosebite, concentrată în special în sideroblaști). Sinteza feritinei în celule depinde de conținutul în fier al acestora: creșterea concentrației în fier favorizează sinteza feritinei și inhibă sinteza receptorului transferinei.

Izoferitina serică este de tip bazic (spre deosebire de cea celulară, este însă glicozilată și fără fier), concentrația acesteia fiind proporțională cu conținutul în fier al celulelor care îl înmagazinează (este marker-ul acceptat pentru aprecierea fierului depozitat): 1 μg/L feritină serică corespunde la 8 mg fier în țesuturile de depozit. Pragul inferior al concentrației serice a feritinei la femei este de 12 μg/L (la bărbații din grupa de vârstă 20-50 ani, valoarea fiind aproximativ triplă). Feritina serică este preluată de ficat (timpul de înjumătățire este de cca. 10 minute). Spre deosebire de sideremie, concentrația serică a feritinei nu are ritm circadian, iar spre deosebire de concentrația transferinei, cea a feritinei nu depinde de sinteza hepatică și nici de prezența estrogenilor. Feritina este și marker tumoral, precum și proteină de fază acută.

10.4.4.4 Haptoglobina

Este o glicoproteină cu masa moleculară de cca. 100 kDa, care migrează electroforetic în fracțiunea α_2-globulinelor. Este alcătuită din două perechi de lanțuri peptidice ușoare (9 kDa) și grele (16 kDa), legate între ele prin punți disulfidice. Există trei tipuri diferite de haptoglobină: 1-1 monomerică (85 kDa), 2-1 dimerică (200 kDa) și 2-2 tetramerică (400 kDa). Rolul fiziologic al haptoglobinei constă în captarea echimoleculară a hemoglobinei libere, rezultate în urma hemolizei intravasculare și transportul acesteia la locul de degradare în sistemul reticuloendotelial (SRE). Hemoglobina monomer este o proteină cu masa moleculară (17 kDa) mai mică decât a albuminei, deci există pericolul pierderii acesteia prin filtrul glomerular. Nivelul plasmatic al haptoglobinei (2,5-4,5 g/L) scade datorită sintezei hepatice deficitare (scăderea producției), sau în hemoliză accentuată (se consumă cantități mari). Timpul de înjumătățire plasmatic al haptoglobinei scade de la 2-4 zile la 30 de minute în caz de hemoliză intravasculară. Dublarea ratei de hemoliză fiziologică conduce la o scădere dramatică a concentrației haptoglobinei plasmatice (aproape de zero). Creșterea consumului nu conduce la o creștere compensatorie imediată a sintezei hepatice. Concentrația haptoglobinei este crescută în inflamații acute (este un reactant de fază acută), în colestază, boala Hodgkin, terapia cu corticosteroizi.

10.4.4.5 Apoproteinele

Sunt transportorii lipidelor plasmatice (*vezi 8.2.1*).

10.4.5 Inhibitorii plasmatici ai proteazelor

Inhibitorii plasmatici ai proteazelor sunt α-globuline reprezentând 10% din totalul proteinelor plasmatice. Au rol în protejarea organismului față de acțiunea proteazelor: inactivează proteazele, complexul celor două proteine fiind recunoscut de receptorii macrofagici specifici hepatici și îndepărtat din circulație. În lipsa antiproteazelor apar leziuni tisulare severe. Principalii inhibitori proteazici plasmatici sunt SERPINE (serin-protease inhibitors): α_1-AT (α_1-antitripsina), α_1-ACT (α_1-antichimotripsina) migrează în fracțiunea electroforetică α_1, iar α_2-AP (α_2-antiplasmina), AT III (antitrombina III) și C1Inh aparțin fracțiunii α_2-globulinelor. În categoria antiproteazelor mai intră PAI (plasminogen activator Inhibitor) și α_2-Mg (α_2-macroglobulina).

La nivel tisular există inhibitori metalo-proteazici (care inhibă colagenaza, gelatinaza) și inhibitori ai cistein-proteazelor (inhibitorii catepsinei B). Antiproteazele au specificitate relativă de acțiune (de exemplu plasmina este inhibată de α_2-AP, α_1-AT și α_2-Mg). Legarea inhibitorului se realizează de obicei specific, la nivelul situsului de legare al substratului (cu excepția α_2-Mg, care copleșește proteaza, izolând-o nespecific de mediul înconjurător).

10.4.5.1 α_1-antitripsina (α_1-AT)

Este o glicoproteină cu masa moleculară de 55 kDa, formată în hepatocite. Concentrația normală în plasmă este de 2 - 3,8 g/L. În condiții fiziologice reprezintă aproximativ 90% din fracți-

unea α1-globulinică a serului. α_1-AT sau α_1-PI (α_1-protease inhibitor) este un reactant de fază acută. Tripsina și chimotripsina, deși enzime digestive, sunt eliberate în cantități mici în circulație ca și elastaza și trombina. Enzimele proteolitice de natură endogenă (digestivă, bacteriană, leucocitară) sau exogenă cu rol în apărarea nespecifică a organismului, pot avea efect autoagresiv dacă sunt eliberate în plasmă. Efectul antiproteazic al α1-antitripsinei se manifestă prin blocarea reversibilă a centrului activ al serinproteazelor, formând complexe echimoleculare cu ele. Din cauza molecularității reduse, α1-antitripsina traversează ușor spațiile interendoteliale, pătrunde în lichidul interstițial, inactivând și serinproteazele eliberate prin exocitoza micro- și macrofagelor. Complexele echimoleculare realizate se întorc în circulație, unde proteazele sunt transmise moleculelor de α2-macroglobulină, iar α1-antitripsina eliberată își reia activitatea. Deficiența înnăscută de α_1-AT duce la apariția emfizemului, hepatitei neonatale și cirozei în copilărie. Alelele posibile sunt următoarele: M - normală, Z - deficit de procesare și eliberare din hepatocite, S - formă ușor degradabilă și varianta nul 0 - (lipsa sintezei). Boala apare la genotipurile 00, ZZ, MZ și MS.

10.4.5.2 α_2-macroglobulina (α_2-Mg)

Este o glicoproteină cu masa moleculară între 725-850 kDa, heterogenitatea masei moleculare fiind cauzată de conținutul variabil în glucide. Se formează în hepatocite, concentrația normală în plasmă fiind de 2,5-4,0 g/L. Acționează ca o antiprotează împotriva serinproteazelor (pepsina, plasmina, elastaza, colagenaza), dar numai în interiorul patului vascular. Inactivează antiproteazele atât în mod direct, cât și sub formele transmise de către α1-antitripsina, dar și de alte antiproteaze ale sistemului de coagulare sanguină. Deși nu este un reactant de fază acută (cantitatea ei plasmatică nu crește în cursul inflamațiilor), cantitatea ei crește la bolnavii cu sindrom nefrotic și scade în hepatopatii. Limitează reacția de fază acută prin legarea citokinelor nefixate pe receptorii celulari.

10.4.5.3 AT III (antitrombina III)

Inactivează eficient trombina și factorul Xa, doar în prezența heparinei. În lipsa heparinei procesul are loc cu o viteză de aproximativ 1000 de ori mai mică.

10.4.5.4 α_2-AP (α_2-antiplasmina)

Are trei situsuri: unul de legare al plasminogenului, altul de inactivare a plasminei și al treilea de legare la fibrină sub acțiunea factorului XIII activat. Deficitul are drept consecință liza prematură a cheagului hemostatic.

10.4.5.5 α_1-ACT (α_1-antichimotripsina)

Nu este esențială ca inhibitor proteazic. Este crescută în țesutul nervos al pacienților cu boala Alzheimer.

10.4.6 Proteine de fază acută

Proteine de fază acută sunt α_1, α_2 și β-globuline a căror producție hepatică crește sub acțiunea citokinelor produse și eliberate de imunocitele implicate în reacții inflamatorii. Concentrația plasmatică a acestora se modifică nespecific, ca răspuns la anumite situații patologice: IMA (infarct miocardic acut), reacții inflamatorii acute și cronice, tumori maligne, traumatisme, intervenții chirurgicale majore.

Funcția acestor proteine este una nespecifică: anihilează proteazele în exces produse în leucocite sau eliberate de bacterii și favorizează fagocitoza.

Proteinele de fază acută sunt clasificate după evoluția activității lor serice, în:

a. proteine cu creșterea rapidă (1-2 ore) și intensă (de 10-2000 ori) a concentrației serice: PCR (proteina C reactivă), amiloidul seric A (SAA),

b. proteine cu creștere mai lentă (24 - 48 ore) și moderată (de 2-5 ori): α_1-AT, α_1-GPac (α_1-glicoproteina acidă), haptoglobina și fibrinogenul,

c. proteine cu creștere lentă (2-3 zile) și modestă (maximum de 2 ori): Ceruloplasmina, C3, C4 și C1 INH,

d. componentele negative ale reacției de fază acută sau proteine anti – fază acută: albumina, prealbumina, colinesteraza, factorul XIII al coagulării și transferina (a căror sinteză hepatică scade de cele mai multe ori în inflamații, sub acțiunea inhibitorie a TNF-α; în cazul transferinei, are loc adeseori o captare a acesteia de către macrofage, împreună cu ionii de fier).

10.4.6.1 PCR

Este o proteină pură sintetizată de hepatocite, alcătuită din cinci lanțuri polipeptidice (masa moleculară fiind 5 x 20 kDa) care nu sunt legate covalent între ele. Concentrația plasmatică normală este sub 1 mg/L (mai mare la supraponderali, fumători,

femei la menopauză cu terapie de substituţie hormonală), nivelul PCR crescând nespecific în multe procese inflamatorii acute infecţioase (mai puţin în cele virale) sau neinfecţioase, uneori de 100-1000 ori în numai 24 ore. Denumirea provine de la faptul că precipită polizaharidul "C" al peretelui pneumococului în prezenţa Ca^{2+}. Fenomenul de ataşare a fost însă observat şi în prezenţa altor microorganisme şi chiar a celulelor lizate, fiind urmat de activarea fagocitozei şi a sistemului complementului pe calea clasică. S-a dovedit că interacţiunea este nespecifică: având afinitate pentru receptorul Fc al macrofagelor şi limfocitelor, PCR facilitează endocitoza bacteriană printr-un proces similar opsonizării. PCR poate precipita şi policationi, hemocianină, fibrinogen şi fibronectină (independent însă de ionul de calciu). Timpul de înjumătăţire plasmatică este de 12-24 ore.

Creşterile modeste ale concentraţiei PCR (până la 10 mg/L), determinabile doar prin tehnici cu sensibilitate înaltă, sunt importante în evaluarea microinflamaţiei în plăcile de aterom şi au valoare predictivă în evaluarea riscului cardiovascular. Valori peste 3 mg/L, la 90% dintre pacienţii cu angină pectorală instabilă, prezic un infarct miocardic acut în următoarele 3 luni. Valori peste 5 mg/L la 72 de ore de la implantarea de stent, indică evoluţia leziunilor aterosclerotice în următoarele luni, iar la 20% dintre pacienţi – complicaţii pe termen scurt.

Creşteri ale concentraţiei PCR la 10-50 mg/L pot surveni în infecţii acute bacteriene locale, infecţii cronice (tbc, sifilis), infecţii virale, colagenoze, colita ulceroasă, infecţii intrauterine în ruptura prematură a membranelor (dozarea procalcitoninei este alternativa preferată în diferenţierea infecţiilor bacteriene).

Creşteri ale concentraţiei PCR peste 50 mg/L pot apare în infecţii bacteriene severe (cel mai adesea generalizate), vasculite sistemice, pancreatită acută, tumori metastatice.

10.4.6.2 Procalcitonina (pCT)

Nu este un reactant de fază acută (sinteza sa nefiind reglată de citokine), ci un prohormon cu importanţă în diagnosticul diferenţial al reacţiilor inflamatorii.

Polipeptidul alcătuit din 116 aminoacizi (13 kDa), cu porţiunea mijlocie (Aa 60-91) identică cu a calcitoninei, este sintetizat în celulele C ale glandei tiroide, iniţial sub forma preprocalcitoninei (141 Aa). Clivarea polipeptidului până la calcitonină este blocată în infecţii bacteriene sistemice (nu şi în infecţii virale, afecţiuni neoplazice, reacţii alergice sau autoimune), în carcinomul tiroidian cu celule C şi în carcinomul bronşic cu celule mici - concentraţia plasmatică a procalcitoninei crescând peste 10 µg/L. Specificitatea marker-ului în diagnosticul sepsis-ului este de peste 90% şi poate fi îmbunătăţită prin dozarea concomitentă a PCR şi a IL-8 (mai ales în cazul infecţiilor nou-născutului).

10.4.6.3 Amiloidul seric A (SAA)

Este produs de macrofagele şi fibroblaştii hepatici sub acţiunea stimulatoare a IL-1, -6, TNF-α, eliberate de imunocite implicate în procese inflamatorii bacteriene şi virale. Concentraţia serică (normal sub 10 mg/L) creşte chiar mai repede (2-4 ore) şi mai pronunţat (până la 2000 ori) decât a PCR. SAA se leagă la micelii lipidice, în special la HDL_3, accelerând degradarea hepatică a acestei subclase Lp.

10.4.6.4 α_1-GP acidă

Se mai numeşte şi orosomucoid. Este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 44 kDa şi cu un conţinut glucidic între 40-45% din greutate, cu predominanţa acidului neuraminic (NANA) şi sialic, care realizează caracterul acid al substanţei. Se formează în hepatocite în cantităţi reduse, sub acţiunea interleukinei 6 (IL-6), alcătuind doar 5% din cantitatea totală a fracţiunii α1-globulinice. Concentraţia normală în plasmă a glicoproteinei α1-acide este de 0,6 – 1,0 g/L. Fiind unul dintre reactanţii de fază acută care participă la apărarea organismului împotriva reacţiilor proprii de apărare excesive, cantitatea ei creşte mult în cursul inflamaţiilor acute, subacute şi cronice, dar şi la bolnavii cu tumori maligne. Funcţia ei nu este cunoscută în totalitate. Se leagă nespecific la suprafaţa bacteriilor, virusurilor, medicamentelor bazice, cum ar fi diverse miorelaxante, psihotrope, beta blocante, progesteron. Se pare că are acţiune imunosupresivă, datorită efectului său inhibitor asupra activării PMN (leucocite polimorfonucleare), dar şi de inhibare a agregării plachetelor. Concentraţia de acid sialic este o măsură a lizei celulare din afecţiuni acute şi/sau cronice.

10.4.6.5 Ceruloplasmina

Este o α_2-globulină care conţine peste 90% din cuprul seric, astfel încât acesta nu poate fi cedat rapid ţesuturilor. Organismul adult sănătos conţine în total 75-150 mg (14-24 mmol) cupru, în primul rând sub forma depozitată în hepatoci-

te. Concentraţia normală în cupru a plasmei este între 15 şi 24 μmol/L (90-110 μg/dL); 10% din cuprul plasmatic este fixat labil de albumine, reprezentând cantitatea cuprului "liber", rapid cedabil în ţesuturi. Din cauza conţinutului ei glucidic variabil, greutatea moleculară a ceruloplasminei se modifică între 130 – 160 kDa, glicoproteina având o structură octamerică (este formată din 4 perechi de peptide α-β, capabile să fixeze fiecare câte un ion cupric). Până în prezent s-au identificat 7 alotipuri diferite ale ceruloplasminei.

Conţinutul în ceruloplasmină al plasmei sanguine a noului născut este foarte redus. Ca urmare, transportul cuprului în organismul lui se face aproape exclusiv sub formă legată de albumine. În cursul primelor luni de viaţă, cantitatea ceruloplasminei creşte treptat în plasmă, realizând la vârsta de un an valoarea normală (respectiv 35 mg/dL). Fiind un reactant de fază acută, cantitatea ceruloplasminei este crescută şi în plasma gravidelor, dar şi în cazuri patologice (inflamaţii microvasculare, ciroză hepatică, infarctul miocardic, tumori maligne etc). Ceruloplasmina dispune şi de o acţiune enzimatică oxidoreductazică, manifestată în cursul lanţului respirator şi nu numai. Se consideră actualmente că ceruloplasmina este importantă mai degrabă ca oxidoreductază, având rolul de a inactiva radicalii liberi capabili să producă leziuni tisulare şi de a oxida ionul de fier în forma transportabilă de transferină (Fe^{3+}). Rolul de transportor nu este unul real, deoarece cuprul legat de ceruloplasmină nu mai este cedat ţesuturilor, ci este transportat la ficat şi eliminat pe cale biliară. Printr-o alimentaţie obişnuită organismul primeşte zilnic o cantitate 50-80 μmol (3-5 mg) cupru. Cantitatea reabsorbită ajunge în ficat şi se fixează de proteinele fixatoare de metale, numite metalotionine, printre care şi hepatocupreina. O parte a cuprului depozitat în hepatocite, prin intermediul aparatului Golgi se excretă în bilă. Prin urină se elimină zilnic 0,3 μmol/zi (20 μg/zi). În boala Wilson (degenerescenţa hepato-lenticulară) această cantitate poate fi şi de 3 ori mai mare. Boala Wilson se moşteneşte autosomal recesiv (forma heterozigotă are prevalenţa de 1:200) şi este caracterizată prin scăderea marcată sau chiar lipsa excreţiei în bilă a cuprului din lizozomii hepatocitelor, datorită scăderii sau absenţei ceruloplasminei, ceea ce provoacă intrarea rapidă a cuprului în ţesuturi, cu depunerea în special în ficat şi nucleii de la baza creierului. Cuprul acumulat în hepatocite provoacă distrugerea acestora. În locul parenchimului hepatic se formează ţesut conjunctiv, ducând la manifestarea progresivă a unei ciroze hepatice grave. Cantitatea mare de cupru eliberată în sânge se fixează lax de albumine. În ciuda creşterii exagerate a cuprului eliminat prin urină, se depun totuşi cantităţi din ce în ce mai mari în ţesuturi, cu precădere în creier, în rinichi şi în cornee. Din această cauză apar tulburări funcţionale nervoase (psihice, motorii), renale şi apariţia inelelor lui Kaiser-Fleischer pe cornee. Depunerea cuprului în ţesuturi poate fi redusă cu ajutorul unor substanţe chelatoare, ca D-penicilamina.

10.4.6.6 Factorii C_3 şi C_4 ai complementului

Cascada complementului intervine în liza bacteriană şi celulară, stimularea chemotaxiei şi fagocitozei.

C_3 este o glicoproteină cu masa moleculară de 180 kDa, formată din două lanţuri peptidice α şi β, legate între ele prin 3 punţi disulfidice. Conţinutul normal al plasmei în C_3 se situează între 0,8-1,2 g/L. Scăderea cantităţii factorului C_3 semnifică un consum sporit (activitate citolitică marcată), iar creşterea valorilor C_3 în plasmă pledează pentru scăderea consumului, adică pentru încetinirea mecanismelor citolitice. Lipsa congenitală a C_3 este o anomalie ereditară rară, transmisă autosomal recesiv, caracterizată prin reducerea capacităţii de apărare umorală nespecifică.

Factorul C_4 al complementului se găseşte în concentraţii mult mai mici 0,1 – 0,4g/L şi se consumă în procesele inflamatorii care decurg cu activarea căii clasice a complementului.

10.4.7 Proteine – markeri tumorali

(*vezi şi Capitolul 19*)

10.4.7.1 α1-fetoproteina

Este o glicoproteină cu masa moleculară de 70 kDa. Se formează în hepatocite, dar numai în cantităţi foarte mici (sub 5 ng/ml). În cursul vieţii embrionare însă are o concentraţie mare în sângele fetal, având funcţia de a fixa şi a neutraliza efectele dăunătoare ale estrogenilor pătrunşi transplacentar la făt din organismul mamei. Cantitatea α1-fetoproteinei scade rapid în sângele nou-născutului. În cazuri de carcinom hepatic însă, gena suprimată se reactivează şi se declanşează biosinteza citoplasmatică a acestui marker tumoral (care nu este un antigen tumoral, ci un antigen asociat

cancerului) într-o măsură în care el poate fi pus în evidență calitativ sau determinat cantitativ. Totuși, specificitatea apariției în plasmă a acestui marker nu este exclusivă, deoarece poate fi întâlnită și în ciroză hepatică, respectiv în inflamații severe.

10.4.7.2 β2-microglobulina

Este formată dintr-un singur lanț peptidic cu masa moleculară de 11,8 kDa. Reprezintă lanțul peptidic ușor al haplotipurilor antigenice de histocompatibilitate de clasa I-a (HLA-A, B și C). Plasma normală conține cantități reduse (1-2 mg/L) de β2-microglobulină, deoarece se filtrează la nivelul glomerulilor renali și se elimină repede prin urină. Cantitatea eliminată renal crește în cursul distrugerilor tisulare (inflamații, tumori maligne, respingerea grefelor), iar cantitatea ei serică crește în stări de anurie. Este necesară alcalinizarea urinei recoltate timp mai îndelungat, deoarece pH-ul acid o descompune.

10.4.7.3 Antigenul carcino-embrionar

Antigenul carcino-embrionar (CEA) este o glicoproteină cu masa moleculară de 180 kDa. Se formează în celulele limfatice din plăcile Payer ale tubului digestiv în cursul vieții embrionare. După naștere, gena structurală este reprimată și în condiții fiziologice plasma copilului și a adultului conțin numai urme de CEA (sub 10 ng/ml). În celulele transformate malign ale tubului digestiv (de la esofag până la rect) gena reprimată este derepresată și determină biosinteza CEA ca un antigen asociat cancerului tubului digestiv. În urma eliminării chirurgicale a tumorii primare, cantitatea în plasmă a CEA scade într-o măsură considerabilă, iar în urma unei recidive crește paralel cu creșterea masei tumorale.

10.4.8 Proteine cu rol în apărarea specifică a organismului

Imunoglobulinele sunt proteine din clasa γ-globulinelor, produse de limfocitele B transformate secretor în plasmocite.

10.4.8.1. Structura imunoglobulinelor

Imunoglobulinele sunt compuși glicoproteinici tetramerici formați din câte o pereche de lanțuri peptidice grele (heavy, H) și ușoare (light L), cu masele moleculare de 44 - 66 kDa, respectiv 22kDa, conținând un număr de 200, respectiv 330 - 340 aminoacizi. Lanțurile sunt cuplate între ele disulfidic în așa fel, încât cele două porțiuni N-terminale sunt îndepărtate între ele sub formă de Y.

Punctul de despărțire a furcii este mobil, sub formă de balama (*hinge*), permițând celor două ramuri o mobilitate unghiulară considerabilă. Prin porțiunile lor cu structura specifică epitopului antigenic, numită paratop, cele două capete N-terminale bifurcate, fixează antigenul și sunt desemnate fragmente Fab (*antigen binding*). Porțiunea C-terminală a moleculei Ig poate fixa factorul C1q al complementului; sub formă izolată poate fi și cristalizată. Din acest motiv a fost desemnată ca fragmentul Fc (c provine de la complement, respectiv cristalizabil), cu care imunoglobulina se fixează în membrana monocitelor și limfocitelor sau poate activa factorii complementului.

Structura secundară a lanțurilor ușoare și grele prezintă bucle, numite domenii (domain), fixate între ele prin punți disulfidice (*Figura 10.4*).

Conform marii variabilități a structurilor epitopilor antigenici și secvența aminoacizilor din cele două domenii N-terminale ale lanțurilor L și H este deosebit de variabilă, dar foarte constantă în restul domeniilor. Ca urmare, fiecare lanț ușor și greu are câte un domeniu N-terminal cu secvența variabilă (LV, HV) și unul cu secvența constantă (LC, HC1).

În porțiunile N-terminale atât ale lanțului greu cât și ale lanțului ușor, există anumite poziții ale aminoacizilor cu caracter hipervariabil, acești aminoacizi fiind esențiali în legarea epitopului antigenic în cavitatea numită buzunar (*pocket*). Aceste porțiuni reprezintă regiunile determinante ale complementarității anticorpilor (Aa30 - CDR1, Aa50 - CDR2 și Aa95 - CDR3, Complementarity Determining Regions). Între domeniile variabile și constante se situează și o porțiune de joncțiune, desemnată J, formată din 4 - 6 resturi de aminoacizi, iar în cazul lanțurilor H încă o porțiune numită D (de diversitate), cuprinzând 8 - 10 resturi de aminoacizi.

În restul domeniilor (HC2 și HC3, respectiv în IgA și HC4) secvența aminoacizilor este constantă. Catenele glucidice laterale sunt fixate pe resturi de acid aspartic sau glutamic, exclusiv în lanțurile H. Lanțurile L nu conțin glucide.

10.4.8.2 Clasificarea imunoglobulinelor

Pe baza secvențelor aminoacidice deosebite (markerilor) prezente în domeniile cu secvența constantă, dar și variabilă ale lanțurilor L și H, pot fi deosebite mai multe grupe: izotipuri, allotipuri și idiotipuri.

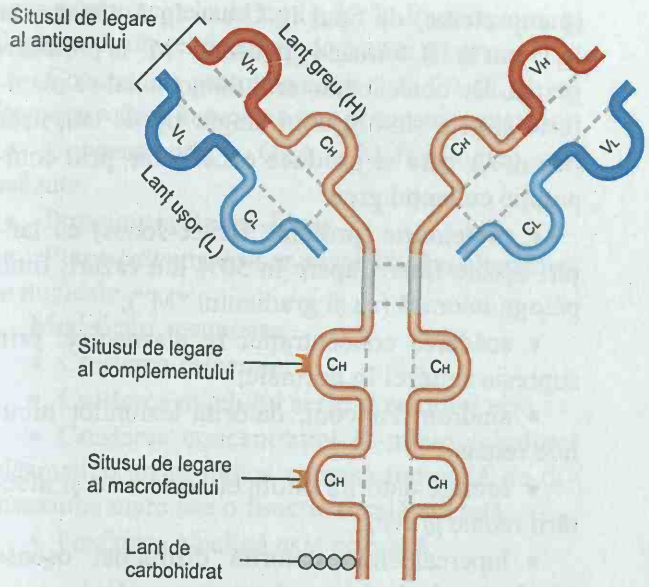


Figura 10.4. Structura pe domenii a imunoglobulinelor

- Lanțurile L au numai două izotipuri: k sau λ; în molecula unei Ig poate fi prezent numai un singur izotip.
- Lanțurile H pot exista sub forma a 5 izotipuri: γ, α, μ, δ și ε. Markerii acestora sunt localizați în domeniile cu secvența aminoacidică constantă și determină clasele de imunoglobuline prezente la toți indivizii speciei umane: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE.
- Unele izotipuri au și allotipuri (subclase), ca urmare a variației unor Aa în zona C a lanțurilor H. Astfel clasa IgG poate avea 4 allotipuri: IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4; cele 2 alotipuri ale clasei IgA sunt IgA1 (forma serică, monomerică) și IgA2 (forma secretorie / dimerică).
- Idiotipurile sunt variantele individuale (idiospecifice) ale claselor Ig, caracterizate prin markeri localizați în domeniile cu secvența aminoacidică variabilă ale lanțurilor LV și HV. În condiții fiziologice sunt mascate (cuprinse în adâncul structurii terțiare a lanțului peptidic).

În cursul reacției antigen - anticorp ele se pot descoperi participând activ la reglarea răspunsului imun umoral (provoacă uneori formarea anticorpilor antiidiotipici sau a anti-anticorpilor). Caracteristicile structurale și funcționale ale claselor de imunoglobuline sunt redate în *Figura 10.4* și *Tabelul 10.III.*

Ig G constituie 75% din imunoglobulinele plasmatice. Sunt anticorpi majori produși ca răspuns la un contact secundar cu un antigen. Străbat endoteliile și placenta, de aceea intervin în imunitatea pasivă a nou-născutului. Neutralizează toxine bacteriene și funcționează ca opsonine (se leagă la suprafața bacteriană favorizând fagocitoza).

Ig A sunt anticorpi majori secretori, se găsesc în lacrimi, salivă, secreții respiratorii, secreții gastro-intestinale, secreții ale tractului uro-genital. În forma binară (IgA_2) conțin 2 lanțuri oligopeptidice: unul joncțional și altul secretor (o glicoproteină). Ig A_2 este rezistentă la acțiune proteolitică și are rol în legarea bacteriilor (le aglutinează), împiedicând penetrarea de către acestea a mucoaselor.

Ig M sunt anticorpi majori produși în timpul răspunsului imun primar. Se produc după naștere (prezența lor la nou-născut indică o infecție intrauterină). Au structură pentamerică, 5 macromolecule de Ig M sunt legate cu un polipeptid joncțional. Factorul reumatoid și izoaglutininele (α și β) de grupă sanguină AB0 aparțin acestei clase.

Ig D sunt imunoglobuline aflate pe suprafața limfocitelor B, cu rol de receptor al acestora pentru antigene. Fiecare limfocit B produce un singur idiotip imunoglobulinic.

Ig E sunt imunoglobuline fixate prin fragmentul Fc, pe suprafața mastocitelor. Cuplarea lor cu antigenul induce degranularea mastocitului cu declanșarea reacției alergice (tip I, anafilactic). Intervin în patogeneza reacției imune patologice de tip I.

Tabelul 10.III. Principalele caracteristici ale claselor de imunoglobuline plasmatice

Clasa de Ig	GM (kDa)	Unități	Fab	Concentrație	Subclase	$T_{1/2}$
Ig G	150	1	2	6-16 g/L	IgG 1 - 4	17 - 35 zile
Ig A	160	1,2	2,4	0,7-4 g/L	IgA 1 - 2	6 – 8 zile
Ig M	900	5	5	0,4-2 g/L	?	5- 7 zile
Ig D	185	1	2	< 40 mg/L	?	3 zile
Ig E	200	1	2	< 0,5 mg/L	?	2 zile

10.4.8.3 Hipergamaglobulinemii

A. Policlonale

Stimularea mai multor linii limfocitare B duce la amplificarea sintezei mai multor tipuri de Ig (pe electroforegramă se constată creşterea globală a fracţiunii γ-globulinelor). Hipergamaglobulinemiile policlonale se produc în infecţii acute şi cronice (mononucleoza infecţioasă, tuberculoză, endocardită bacteriană), boli autoimune (lupus eritematos diseminat - Ig G şi Ig M, poliartrită reumatoidă - Ig A, Ig M, sindromul Sjögren, sclerodermie), afecţiunile hepatice acute şi cronice (ciroză, hepatită cronică activă, hepatită virală acută).

B. Oligoclonale

Stimularea unui număr restrâns de clone limfocitare B duce la amplificarea sintezei tipurilor de imunoglobuline produse de acestea (pe electroforegramă apar zone mai restrânse ca dispunere, benzi discrete, omogene în fracţiunea γ-globulinelor). În paraproteinemii pot apare de asemenea benzi oligoclonale.

C. Monoclonale

Proliferarea unei singure clone celulare B duce la sinteza excesivă a unui singur tip de imunoglobulină patologică (paraproteină), care formează "gradientul M" (monoclonal) în electroforegramă. Cea mai frecventă cauză este de natură malignă - mielomul multiplu (plasmocitom), macroglobulinemia Waldenström, rar leucemia limfocitară cronică, limfoamele nonhodgkiniene cu celule B (ultimele două se caracterizează prin proliferări de limfocite cu dimensiune redusă şi producţie scăzută de imunoglobuline) şi cauze "benigne" (hepatita cronică, ciroza hepatică).

Mielomul multiplu

Mielomul multiplu este cauza cea mai comună a paraproteinemiilor, constând din proliferarea malignă diseminată a plasmocitelor în măduva osoasă.

Caracteristici clinice:

- dureri osoase (datorită proliferării tumorale), fracturi osoase;
- anemie, sângerări (datorită înlocuirii măduvei osoase hematogene);
- infecţii recurente (datorită scăderii leucocitelor şi cantităţii imunoglobulinelor normale);
- tulburări ale funcţiei renale (proteinurie, creşterea calciului şi acidului uric în ser şi urină);
- sindrom de hipervâscozitate (datorat creşterii concentraţiei proteinelor plasmatice).

Biochimic:

- creşterea concentraţiei proteinelor plasmatice prin creşterea sintezei proteinelor anormale (paraproteine) de tipul Ig G sau Ig A (foarte rar Ig D sau Ig E), formând gradientul "M" în proteinogramă. De obicei caracterul monoclonal se manifestă şi prin sinteza unui singur tip de lanţ uşor (κ sau λ), care se produce excedentar, prin comparaţie cu lanţul greu.
- proteinurie (proteine Bence-Jones) cu lanţuri uşoare libere, apare în 50% din cazuri, fiind patognomonică (ca şi gradientul "M");
- scăderea concentraţiei Ig plasmatice, prin supresia sintezei Ig normale;
- sindrom Fanconi, datorită leziunilor tubulare renale;
- uremie datorită citolizei accelerate şi afectării renale grave;
- hipercalcemie datorită distrucţiei osoase (fosfataza alcalină osoasă este normală).

Macroglobulinemia Waldenström

Această boală este caracterizată printr-o tumoră cu limfo-plasmocite (celulă cu un stadiu de maturare intermediar între limfocitele B şi plasmocite) producătoare de Ig M – lanţuri grele libere de tip μ.

Macroglobulinemia Waldenström nu provoacă dureri osoase sau creşterea calcemiei, deoarece tumora se dezvoltă în ganglioni, splină, ficat (limfadenopatii şi hepato-splenomegalie). Hipervâscozitatea plasmatică (datorită greutăţii moleculare mari a Ig M) dă principalele *manifestări clinice* (scade viteza circulaţiei prin capilare): dureri de cap, oboseală, tulburări de vedere, retinopatie, tendinţă crescută la tromboze, anemie, scăderea rezistenţei la infecţii. Are un prognostic mai favorabil decât mielomul multiplu. Paraproteinele sunt frecvent crioglobuline.

Crioglobulinele sunt Ig care precipită la 4°C şi se redizolvă prin încălzire la 37°C. 50% din crioglobuline sunt paraproteine, altele sunt complexe Ig - anti Ig (cel mai adesea produse la factorul reumatoid). Unele crioglobuline precipită chiar la temperaturi peste 22°C, acestea cauzează simptome clinice. Iarna sau la temperatură scăzută în capilarele extremităţilor pot precipita crioglobuline. *Sindromul Raynaud* (caracterizat prin dureri episodice de natură ischemică la nivelul extremităţilor, determinate de scăderea temperaturii) are printre cauze şi crioglobulinemia.

Investigarea paraproteinemiilor

- Electroforeza proteinelor, pe care se poate observa "gradientul M", cel mai frecvent în zona γ globulinelor, mai rar în zonele α_2-β. În fracţiunea γ

apar paraproteinele de tip Ig, iar în fracțiunile α_2 și β găsim de obicei polimeri de lanțuri ușoare.

- Concentrația paraproteinelor peste 10 g/L și valoarea crescândă în evoluție sunt parametri importanți.
- Concentrațiile Ig G, A și M fiziologice sunt scăzute.
- Proteinuria Bence-Jones.
- Plasmocite medulare peste 7% din elementele nucleate.

Modificări secundare:

- Creșterea calcemiei.
- Creșterea nivelului seric al acidului uric.
- Creșterea concentrației β_2-microglobulinei plasmatice poate indica o masă tumorală de dimensiune mare sau o funcție renală alterată.
- Fosfataza alcalină este normală.

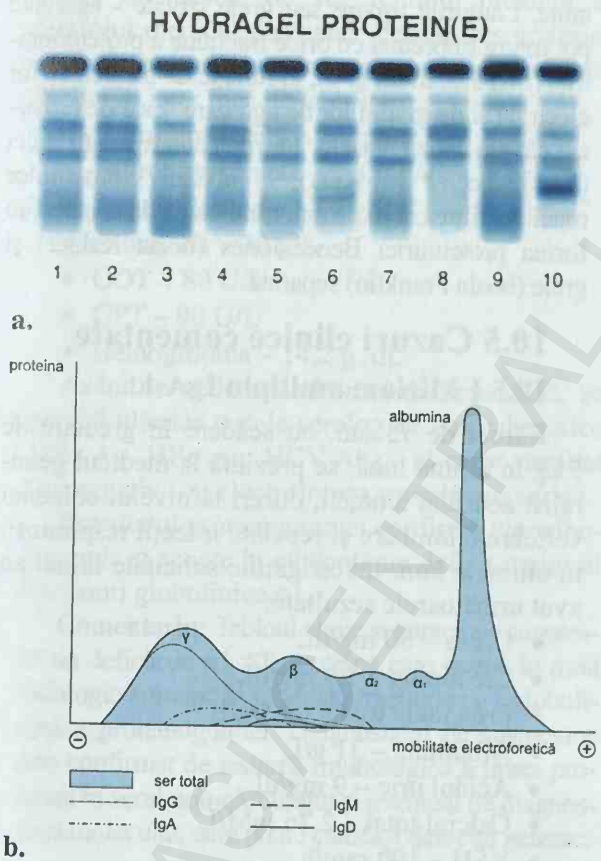


Figura 10.5. a) Aspectul grafic al unor proteinograme normale (5) și patologice: inflamație acută (1, 2, 4); inflamație cronică (3); ciroză (9); sindrom nefrotic (8); gradient monoclonal "M" în γ_1, γ_2 (6 și 10). **b)** Interpretarea densitometrică a unui traseu electroforetic proteic

10.4.8.4 Deficitul de imunoglobuline

Se consideră deficiență semnificativă dacă valoarea Ig este de 10 ori mai mică decât limita normală inferioară (Ig G - 600 mg/dL, Ig A - 50 mg/dL, Ig M - 40 mg/dL).

La nou-născut există o deficiență "fiziologică" de Ig, deoarece cu excepția Ig G, restul nu trec prin placentă (IgG trece în ultimul trimestru al sarcinii). Ig G matern conferă imunitate pasivă nou-născutului față de diferiți agenți patogeni. Aceste Ig G sunt catabolizate la 1-3 luni de viață, când sinteza Ig proprii este încă deficitară.

Deficiențele de Ig pot fi:

- **secundare**: în tumori limfoide (mielom multiplu, boala Hodgkin, leucemie limfocitară cronică), tratament cu medicamente citotoxice și steroizi, sindrom nefrotic, enteropatii cu pierderea proteinelor din tubul digestiv.
- **primare** (genetice):
  - *Agamaglobulinemia primară Bruton*, legată de cromozomul X (apare la băieți).
  - *Deficitul selectiv de Ig A* (ambele subclase): incidența acestei boli este 1:500 în populație. Unii indivizi par sănătoși, alții au frecvent infecții respiratorii și gastro-intestinale, diaree cronică, sunt predispuși la boli cu complexe imune circulante, cum ar fi lupusul eritematos diseminat (LED), poliartrita reumatoidă (PR).
  - *Sindromul de hiper- Ig E* (sindromul Job): se caracterizează prin infecții pulmonare și cutanate. Deși crește nivelul Ig E, există o deficiență funcțională a leucocitelor polimorfonucleare (PMN), crește numărul eozinofilelor.

10.4.9 Proteinograma serică

Fracționarea electroforetică a proteinelor serice la pH alcalin se face în medii gelificate (agar, agaroză, acrilamidă, amidon, acetat de celuloză etc). În funcție de vitezele lor de migrare, proteinele se separă în 5 fracțiuni deosebite: albuminele migrează cel mai rapid, urmate succesiv de α_1, α_2, β și γ globulinele. Aspectul traseului electroforetic, precum și interpretarea densitometrică, sunt prezentate în *Figurile 10.5 a, b (vezi și Capitolul 11)*.

În cursul evoluției diferitelor procese patologice, cantitatea proteinelor se modifică în mod nespecific, prin manifestarea hipoproteinemiilor sau hiperproteinemiilor, cu scăderea cantității albuminelor și creșterea globulinelor. Totuși, pe baza unor aspecte caracteristice/tipice ale proteinogramelor, pot fi deosebite următoarele 5 tipuri de disproteinemie:

10.4.9.1 Tipul inflamației acute

Acest tip este caracterizat printr-o creștere moderată a proteinemiei, o scădere mai puțin accentuată a cantității albuminelor, o creștere accentuată a α1 și una marcată a α2-globulinelor, purtătoarele reactanților de fază acută, însoțită de o moderată creștere a γ globulinelor.

10.4.9.2 Tipul inflamației cronice

Este caracterizat printr-o hiperproteinemie și o hipoalbuminemie exprimată, o creștere mai moderată a α1 și α2 globulinelor, însă printr-o creștere însemnată a γ - globulinelor neomogene (cu bază largă în proteinogramă). Creșterea concomitentă a α-2 globulinelor pledează pentru o inflamație subacută sau cronică - activată.

În **afecțiuni hepatice** acute apar modificări necaracteristice și neînsemnate ale proteinogramei, comparativ cu creșterea transaminazelor și scăderea raportului AST/ ALT. În sindromul posthepatitic creșterea fracțiunii γ-globulinelor indică evoluția spre cronicizare. Aspectul este policlonal, mai accentuat în cirozele hepatice. În angiocolite și ciroze biliare se remarcă creșterea fracțiunii α_2-globulinelor și mai puțin a γ-globulinelor. În neoplasme hepatice electroforeza proteinelor are valoare diagnostică redusă, cu excepția tumorilor hepatice cu ciroză: scad albuminele, cresc γ-globulinele și cresc foarte mult α_1-globulinele.

10.4.9.3 Tipul sindromului nefrotic

Prin scăderea marcată (din cauza eliminării lor renale) a cantității albuminelor serice, proteinograma prezintă aspectul opus al tipului anterior. În sindromul nefrotic se pierd proteine cu masă moleculară mică: albumine și α_1-globuline (α1-AT, α1-ACT, α_1-GPacidă, AT III, transferina). Excepția o constituie factorii coagulării vitamina K dependenți (II, VII, IX, X) și proteina C, care datorită radicalilor de acid gama-carboxiglutamic din moleculă au sarcini negative suplimentare, ceea ce le conferă o puternică electronegativitate și astfel se resping cu membrana electronegativă a capsulei Bowman. Pierderea proteinelor prin urină duce la scăderea presiunii coloid-osmotice din plasmă, ceea ce produce stimularea globală a sintezei hepatice de proteine. Proteinele cu masă moleculară mică se pierd în continuare, iar cele cu masă moleculară mai mare (α_2, β-globuline: α_2-Mg, fibrinogenul, factorul XIII al coagulării, lipoproteinele cu ApoB, Ig M, fibronectina) sunt reținute, contribuind la menținerea presiunii oncotice în plasmă.

10.4.9.4 Tipul gradientului monoclonal "M"

În cazul transformării maligne a unei populații omogene (clone) limfocitare B, populația plasmocitară derivată din aceasta produce un singur fel de imunoglobulină sau fragment al acesteia, numită „monoclonală". Aceste proteine se prezintă în clasa gamaglobulinelor proteinogramelor sub forma unor fracțiuni omogene, intense și cu baza îngustă, numită gradient **monoclonal** ("M"). Proteinele din gradientul M au fost denumite **paraproteine**, pe baza considerentului că ele au compoziția aminoacidică și structura diferite de cele normale. În cazul moleculelor complete tetramerice, clasa imunoglobulinelor monoclonale poate fi stabilită cu o aproximație bună, după localizarea lor: IgM în γ1 (macroglobulinemia Waldenström), IgA în γ1-2 și IgG în γ2-3. Lanțurile ușoare sau grele izolate, pot fi identificate cu ajutorul unor seruri imune monospecifice precipitante. Lanțurile ușoare sau grele izolate - agregate pot migra împreună cu orice fracțiune a proteinogramei (mai ales în α2 și β), în funcție de încărcarea lor electrică și de gradul lor de agregare. Este de remarcat că, din cauza maselor lor moleculare relativ mici (22, respectiv 44 KDa), la nivelul glomerulilor renali se filtrează în primul rând lanțurile ușoare sub forma proteinuriei Bence-Jones (boala Kahler) și grele (boala Franklin) separate.

10.5 Cazuri clinice comentate

10.5.1 Mielom multiplu IgA-k

Bărbat de 75 ani, cu scădere în greutate de 5 kg în ultima lună, se prezintă la medicul generalist acuzând amețeli, dureri la nivelul coloanei vertebrale lombare și repetate infecții respiratorii în ultimele luni. Investigațiile solicitate inițial au avut următoarele rezultate:

- Ureea – 80 mg/dL
- Creatinina – 1,6 mg/dL
- Proteinele totale – 85 g/L
- Albumina – 31 g/L
- Acidul uric – 9 mg/dL
- Calciul total – 2,76 mM/L
- VSH – 100 mm/h
- Hemoglobina – 8,8 g/dL
- Frotiul periferic: anemie normocromă, normocitară și hematii așezate în rulouri

Radiografiile osoase au demonstrat leziuni tipice pentru mielomul multiplu (rarefieri cu aspect perforant) la nivelul vertebrelor lombare, coastelor și sternului. Electroforeza proteinelor serice solicitată ulterior a demonstrat prezența

unei paraproteine în zona gama2 a globulinelor (cu hipogamaglobulinemie marcată), care la imunofixare s-a dovedit a fi IgA-k. În urină s-a evidențiat proteina Bence-Jones de tip k.

Comentariu: descrierea este tipică pentru un mielom multiplu; în mai mult de 50% din cazuri paraproteina este de tip Ig G, sub 20% din cazuri de tip IgA. Anemia și deficitul imun se datorează înlocuirii măduvei osoase normale de către linia plasmocitară malignă. Diagnosticul se bazează pe triada: Paraproteina serică + Bence-Jones urinare + prezența masivă a plasmocitelor în măduva osoasă (> 7 %). Deși modificările sunt tipice, punctatul medular rămâne investigația care confirmă diagnosticul (dacă infiltrația nu este masivă, adeseori examenul de măduvă nu evidențiază însă plasmocite).

10.5.2 Deficit de alfa-1-antitripsină

Un nou-născut de sex feminin prezintă la controlul medical postnatal: detresă respiratorie, emfizem pulmonar, valori crescute ale transaminazelor și icter încă de la naștere:

- Bilirubina totală – 4 mg/dL
- Bilirubina directă – 0,3 mg/dL
- Proteinele totale – 54 g/L
- Albumina – 30 g/L
- GOT – 80 U/L
- GPT – 90 U/L
- Hemoglobina – 14,2 g /dL.

Având în vedere sindromul de hepatoliză, se solicită ulterior testele serologice virale hepatice (HBs Ag, HBe Ag, HCV Ab) - al căror rezultat este negativ – și electroforeza proteinelor serice.

Rezultatul proteinogramei confirmă hipoalbuminemia și scoate în evidență un deficit major al fracțiunii globulinice α1.

Comentariu: Tabloul clinic și paraclinic sugerează un deficit de α1 AT, proteină care ocupă în mod fiziologic aproape în totalitate fracțiunea α1 globulinică a proteinogramei. Diagnosticul de suspiciune este confirmat de testarea imunologică a lipsei proteinei în serul nou-născutului și eventual de diagnosticul molecular, care poate clarifica defectul genetic.

10.5.3 Reacție de fază acută

Un tânăr de 20 de ani, accidentat grav în urma unui eveniment rutier, este internat de urgență și se intervine chirurgical pentru o fractură deschisă la nivelul coapsei stângi. La internare în spital pacientul prezenta următoarele rezultate de laborator:

- Ureea – 40 mg/dL
- Creatinina – 1,1 mg/dL
- Proteinele totale – 65 g/L
- Albumina – 36 g/L
- Acidul uric – 5 mg/dL
- CK total – 250 U /L
- VSH – 10 mm / h
- Hemoglobina – 10,2 g /dL.

După 2 zile de la intervenție, starea pacientului s-a deteriorat – acesta prezentând febră severă, frisoane, obnubilare, evoluție crescătoare a concentrațiilor PCR serice și a procalcitoninei, scăderea albuminei și creștere a α1 / α2 globulinelor în electroforegrama proteinelor serice.

Comentariu: Tabloul clinic și al proteinelor serice sugerează o exacerbare a reacției de fază acută; se suspicionează stare de sepsis, se recoltează hemoculturi și se lărgește spectrul antibioterapiei.

10.5.4 Anemie feriprivă

Un bărbat de 39 de ani, cu ulcer duodenal în antecedente, se prezintă la consult acuzând vertij, migrene, slăbiciune, dispnee, scaune repetate închise la culoare (melenă), în zilele precedente. Gastroscopia a evidențiat o nișă duodenală hemoragică. Investigațiile de laborator au dat următoarele rezultate:

- Ureea – 40 mg/dL
- Creatinina – 1,0 mg/dL
- Proteinele totale – 65 g/L
- Glicemia – 86 mg/dL
- Fier – 6 μM /L
- Transferina – 4,6 g/L
- VSH – 20 mm/h
- Hemoglobina – 9,6 g/dL
- Hematocrit: 30%
- Numărul de hematii (RBC): $3,6x10^{12}$/L
- HEM (MCH): 27 pg
- VCM (MCV): 83 fL
- Frotiul periferic: hematii hipocrome, microcitare.

Comentariu: Tabloul clinic și paraclinic sugerează o anemie microcitară secundară pierderilor îndelungate la nivel digestiv. Odată cu scăderea sideremiei, apare o creștere marcată a capacității latente de legare a transferinei și mai ales a receptorului solubil al transferinei TfR. Dozarea concomitentă a acestor parametri, precum și a feritinei clarifică gradul deficienței. Starea depozitelor de fier la pacientul în cauză: concentrația serică a feritinei este 13 μg/L (valoare normală la femei, mică însă la bărbați).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

10.5.5.Ciroză hepatică alcoolică

O femeie de afaceri de 44 de ani prezintă la un control medical de rutină următoarele rezultate ale testelor de laborator:

- Bilirubina totală – 1,4 mg/dL
- Bilirubina directă – 0,4 mg/dL
- Proteinele totale – 65 g/L
- Albumina – 33 g/L
- GOT – 150 U/L
- GPT – 130 US/L
- Falc – 350 U/L
- GGT – 200 U/L.

Comentariu: Având în vedere că persoana se afla în stare de aparentă sănătate, fără antecedente care să explice afectarea hepatică, dar cu teste pozitive de citoliză hepatică și cu relativă colestază (activitate crescută a enzimelor produse de tractul biliar), se recomandă efectuarea testelor serologice virale hepatitice, o proteinogramă și a unui examen ecografic abdominal. Testele virale au ieșit negative, dar ecografia abdominală a evidențiat steatoză hepatică. La electroforeza de proteine serice a fost evidențiată o hiper γ globulinemie și puntea γ–β2, caracteristică pentru ciroza hepatică. În ciuda faptului că persoana neagă consumul de alcool, tabloul paraclinic sugerează o ciroză hepatică pe fondul unui consum cronic de alcool. Puncția biopsie hepatică ar putea clarifica gradul de afectare al parenchimului. Renunțarea la alcool este esențială pentru stoparea procesului.

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.7-34.
2. Bishop M.L., Fody E.P. – *Reference values for frequently assayed clinical chemistry analytes*. In *Clinical Chemistry: Principles procedures, correlations*, Ed 5, Philadelphia, 2005, Lippincott, Williams & Wilkins.
3. Bradwell A.R., Mead G.P., Carr-Smith H.D. – *Serum Free Light Chain Analysis*, Ed. 3, Bradwell, 2005.
4. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
5. Campbell P., Smith A.D. – *Biochimie ilustrată*, Ed. Academiei Române 2004, traducere după - *Biochemistry illustrated*, Churchill Livingstone - Elsevier Science 2000.
6. Cucuianu M., Rus H.G., Niculescu F., Vonica A. – *Biochimie: Aplicații clinice*, Ed.Dacia, Cluj-Napoca 1991.
7. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleşca-Manea Luminița – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca 1998.
8. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleşca-Manea Luminița – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică*, 2003.
9. Devlin T. – *Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992.
10. Fischbach F. – *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
11. Hobai Ş., Andras Ibolya, Nemes Nagy Eniko, Fazakas Zita – *Biochimie Medicală*, Ed. Veritas Tg.Mureş, 2001.
12. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991.
13. Kaplan A.L., Pesce J.A. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984.
14. Kondi Natalia Mitrică – *Laboratorul Clinic – Biochimie*, Ed Medicală, 1981.
15. Kondi V. – *Laboratorul Clinic - Hematologie*, Ed Medicală, 1981.
16. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996.
17. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry*, Ed.6, Mosby, 2008, p. 253-270.
18. Mayne P.D. – *Clinical Chemistry in diagnosis and treatment*, Ed 6., Arnold, 1994.
19. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, 1994.
20. Mihele Denisa – *Biochimie Clinică. Metode de laborator*, Ed. Medicală, 2000.
21. Mihele Denisa – *Biochimie Clinică*, Ed. Medicală, 1997, p. 88-112.
22. Mody E., Funduc Ileana, Alexandrescu Ruxandra, Dobreanu Minodora – *Biochimie Clinică*, MedicALL Educational, 2000.
23. Nelson D., Cox M. – *Lehninger Principles of Biochemistry*, Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005.
24. Pagana Kathleen, Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 173-175, 434- 440.
25. Popescu Aurora, Cristea Elena, Zamfirescu-Gheorghiu Marcela – *Biochimie medicală*, Ed. Medicală, 1998, 2000.
26. Stryer L. – *Biochemie*, Ed.4, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.

Capitolul 11.
Metode de separare şi caracterizare a proteinelor

Ileana Funduc

Introducere

Pentru separarea proteinelor s-au efectuat de mult timp studii, datorită importanței sale şi a impactului major pe care îl are asupra sănătății umane. În prezent, tehnologia pentru separările proteinelor îşi are originile în nanotehnologie şi metodele includ determinările imune, electroforeza şi cromatografia. O importanță deosebită o are identificarea proteinelor de concentrație scăzută din matricele biologice complexe.

Separările multidimensionale de proteine trebuie să fie de viteză înaltă şi să utilizeze pentru identificare spectrometria de masă. Abordarea prin care metodele de separare se combină între ele (incluzând recunoaşterea, electroforeza şi cromatografia) se explică prin faptul că numai o singură variantă nu poate caracteriza proteinele dintr-o matriță biologică. Separarea proteinelor reprezintă o arie de dezvoltare tehnologică, iar înțelegerea principiilor separării proteinelor din punct de vedere molecular şi a posibilității evidențierii de concentrații foarte mici, vor deschide noi direcții de cercetare.

11.1 Electroforeza

11.1.1 Principiu

Electroforeza se defineşte ca migrarea particulelor încărcate electric sub influența unui câmp electric. Metoda permite separarea amestecurilor de proteine, deoarece speciile individuale ale acestora prezintă viteze diferite când sunt supuse acțiunii unui câmp electric, datorită grupărilor încărcate pozitiv şi negativ pe care le posedă. Proprietățile proteinelor acide şi bazice în soluție apoasă depind de numărul grupărilor acide şi bazice libere, de constantele de disociere şi de distribuția acestor grupări în moleculă. Cum proteinele se pot comporta ca acizi sau ca baze, în funcție de pH-ul soluției, ele se definesc ca substanțe amfotere. În soluții acide este împiedicată disocierea grupărilor carboxil, astfel încât majoritatea proteinelor rămân încărcate pozitiv (ionii de hidrogen ataşându-se grupării amino) şi migrează spre catod. În soluțiile bazice protonul grupării - COOH este îndepărtat şi cele mai multe proteine rămân încărcate negativ şi migrează spre anod (*Figura 11.1*).

Pentru a înțelege mecanismul electroforezei trebuie să se cunoască o serie de noțiuni legate de acesta.

Puterea ionică a sistemului tampon depinde de natura chimică a speciilor de ioni implicați.

Sarcina netă a proteinei este determinată de structura ei chimică, numărul grupărilor acide şi bazice şi de gradul său de disociere. Statusul de ionizare al unei proteine este determinat de constanta de disociere şi de pH-ul mediului.

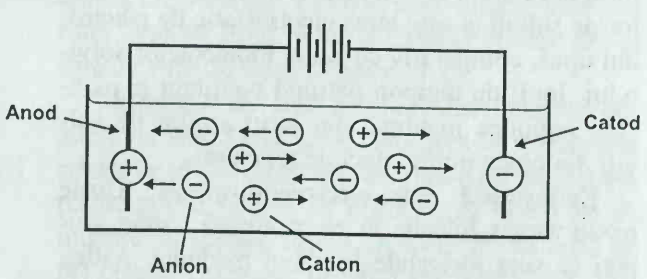


Figura 11.1. Mişcarea ionilor într- un câmp electric în timpul electroforezei.

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La pH izoelectric (p_i) suma algebrică a sarcinilor pozitive şi negative ale proteinei este nulă şi în consecinţă ea nu poate migra. Cu cât diferenţa dintre p_i a proteinei şi a tamponului este mai mare, viteza de migrare este mai mare.

Mobilitatea electroforetică este viteza de migrare a moleculelor sub influenţa câmpului electric. Identificarea proteinelor se face în funcţie de mobilitatea lor electroforetică, care este direct proporţională cu potenţialul aplicat, cu distanţa dintre electrozi, cu durata electroforezei şi invers proporţională cu puterea ionică a tamponului.

Există o serie de forţe care se opun forţei de înaintare a proteinei, a căror sumă poartă numele de forţă de rezistenţă. Una dintre cele mai importante este forţa de fricţiune. În mediu de gel, aceasta este dependentă de mărimea particulei ce migrează, de mărimea porilor şi de densitatea încărcăturii nete de suprafaţă a matricei de gel.

Soluţia tampon este esenţială în ceea ce priveşte transportul curentului şi menţinerea pH-lui în sistemul electroforetic. Tamponul are o mare influenţă asupra migrării proteinelor, pH-ul său influenţând încărcătura proteinei şi deci direcţia şi viteza migrării sale. Puterea ionică a tamponului influenţează proporţia curentului transportat de către proteină. La putere ionică mică, proteina va transporta o proporţie relativ mare de curent şi va avea o migrare relativ rapidă. La putere ionică mare, cea mai mare parte de curent va fi transportat de ionii de tampon şi proteina va migra relativ lent. Deci se preferă o putere ionică scăzută, deoarece va creşte viteza de migrare a proteinei şi se generează o căldură mai mică. De fapt nu puterea ionică este factorul important în electroforeză, ci mobilitatea ionilor de tampon.

Ionii tamponului pot fi atraşi electrostatic de ionii solviţi şi pot forma un nor de contraioni în jurul acestora. Acest nor reduce încărcătura ionilor de solviţi şi este atras electrostatic de electrodul opus, comparativ cu cel al moleculelor solvitului. Ionii de tampon pătrund continuu şi părăsesc regiunea imediată din jurul ionilor de solviţi, fenomen numit efect de relaxare.

Endosmoză sau electroendosmoză. Unele medii suport folosite în electroforeză conţin grupări ce sunt ionizabile la pH-ul mediului. Astfel, suporturile statice, mediile (de gel) şi/sau echipamentul de suprafaţă al separării (plăci de sticlă, tuburi sau capilare) pot transporta grupări încărcate electric (grupări carboxilice în amidon şi agaroză, grupări sulfonice în agaroză, oxid de siliciu în suprafeţele de sticlă). Ele se ionizează sub influenţa tampoanelor acide sau bazice, dobândesc în timpul electroforezei o încărcătură negativă netă şi sunt atrase spre anod,dar fiind fixate în matriţă, ele nu pot migra. Aceasta determină o compensare a contrafluxului de ioni de hidroniu H_3O^+ care se deplasează spre catod. În geluri, acest efect se observă ca un flux de apă spre catod, care transportă cu el substanţele solubilizate. Fracţiunile rezultate sunt estompate, iar în aria anodală se produce uscarea gelului. Aceasta cauzează deplasarea spre catod a moleculelor neutre electric din probă, efect cunoscut sub numele de "endosmoză" sau electroendosmoză" în electroforeza pe gel şi "flux electroosmotic" în electroforeza capilară.

Temperatura. Prin trecerea curentului electric printr-un conductor, temperatura sistemului electroforetic tinde să crească şi aceasta poate cauza:

- creşterea adsorbţiei solviţilor şi creşterea puterii ionice a soluţiei tampon datorită evaporării sale;
- scăderea vâscozităţii ce poate duce la creşterea difuziei şi la reducerea puterii de rezoluţie a fracţiunilor separate;
- evaporarea componenţilor volatili, care poate duce la tulburarea omogenităţii câmpului electric.

De aceea este eficientă folosirea unui sistem de răcire cuplat cu un curent scăzut, pentru a preveni creşterea temperaturii în timpul migrării.

Suportul electroforetic trebuie să fie ieftin, stabil, netoxic, rezistent la umezeală şi uscare, uniform poros şi să facă legătura dintre mărimea proteinei şi mobilitatea sa.

Suportul electroforetic poate fi: hârtia (care se foloseşte rar), acetatul de celuloză, amidonul, agaroza, poliacrilamida. Diametrul porilor trebuie să fie mai mare comparativ cu cel al proteinei, interacţiunea cu proteina să fie minimă, iar fenomenul de endosmoză să fie minim. Dacă mărimea porilor este egalabilă cu cea a proteinei, separarea se face prin fenomenul de sitare : moleculele mici au o viteză de migrare mai mare faţă de moleculele mari şi se vor separa mai rapid (cazul poliacrilamidei).

Acetatul de celuloză este un derivat granulat mai fin decât celuloza, format prin esterificarea unei proporţii de grupări hidroxil libere ale celulozei. Acest suport separă benzi proteinice nete, cu o rezoluţie superioară hârtiei, reacţionează puţin cu proteinele şi prezintă o endosmoză redusă.

Gelul de amidon este nebiodegradabil, netoxic şi are o structură microreticulară, datorită căreia permite fenomenul de sitare a gelului, care a revoluţionat tehnica electroforetică, prin creşterea

semnificativă a rezoluției şi a sensibilității sale. Un dezavantaj al amidonului este variabilitatea sa, datorită faptului că este un produs natural.

Agaroza este un gel de agar ce conține două polizaharide rezultate din galactoză. Acest suport reprezintă o agarobioză cu urme de sulfat, care se gelifică în prealabil prin legături de hidrogen. Agaroza are o structură macroreticulară care nu împiedică migrarea electroforetică a moleculelor sub 500 kDa şi poate fi obținută într-o formă în care electroendosmoza să fie nulă.

Poliacrilamida este un polimer sintetic de înaltă reproductibilitate, la care se poate adapta mărimea porilor la mărimea proteinei ce se separă. Din această cauză, acest polimer este foarte utilizat.

11.1.2 Etapele electroforezei

- Aplicarea probei pe suport
- Migrarea sub voltajul şi amperajul stabilit, care creează câmpul electric
- Fixarea fracțiunilor în gel pentru a preveni difuzia fracțiunilor se realizează cu o soluție de fixare formată din acid tricloracetic, acid acetic, solvenți organici. Electroforeza capilară nu necesită fixare
- Colorarea cu Amido Black 10B, Coomasie Brilliant Blue R 250 sau Violet
- Aur coloidal, Argint amoniacal, acid - Fast Green, acid periodic – Schiff (PAS), Xilen-G, după care urmează îndepărarea surplusului de colorant
- Determinarea calitativă şi cantitativă prin examinare vizuală, densitometrie optică în ultraviolet. Rezultatul evaluării este dependent de concentrația proteinelor, de temperatură, timp de colorare, caracteristicile colorantului folosit şi afinitatea diferită pentru diverse fracțiuni proteice.

11.1.3 Clasificarea metodelor electroforetice

Separarea electroforetică se bazează pe 3 variabile importante:

- încărcătura electrică netă;
- masă moleculară;
- pH izoelectric (p_i).

În funcție de aceste variabile există trei variante principale de electroforeză:

1. **Electroforeză zonală** pe acetat de celuloză sau agaroză, prin care separarea are loc pe baza încărcăturii electrice nete şi secundar în raport cu mărimea moleculară. Proteinele, transportând o încărcătură netă (datorită ionilor amino şi carboxil) la un pH diferit de p_i, vor migra cu o viteză proporțională cu densitatea lor. În cazul suporturilor relativ inerte, separarea proteinelor se bazează pe densitatea încărcăturii lor, corespunzătoare pH-lui selectat. Deci în acest caz, pH-ul este constant şi creează o densitate de încărcătură la suprafața moleculei, care conduce la o migrare cu o mobilitate constantă.

2. **Electroforeza în poliacrilamidă (PAGE).** Prepararea probei implică dizolvarea sa înaintea electroforezei într-un tampon, care conține în mod obişnuit un agent reducător (cum ar fi 2-mercaptoetanolul). Fixarea se efectuează prin denaturare sau se realizează, pentru a preveni difuzia fracțiunilor, atunci când rezoluția este redusă. Pentru a obține date cantitative cât mai fidele, se recomandă includerea unor probe de referință, care să migreze concomitent cu probele.

Adăugarea la tampon a sodiu-dodecilsulfatului (SDS) a condus la variante de electroforeză **SDS-PAGE** în care se elimină esențial diferențele dintre încărcăturile electrice şi separarea se face exclusiv pe baza masei moleculare.

Sodiu dodecilsulfatul (SDS) este un detergent anionic care permite denaturarea proteinelor până la structura lor primară lineară, separarea făcându-se prin cernere. Cum diferențele intrinseci de sarcină între proteine sunt mascate de SDS, separarea proteinelor se datorează diferențelor lor de mărime şi deci metoda se poate folosi şi pentru determinarea masei moleculare.

3. **Electroforeza cu focalizare izoelectrică** permite separarea componentelor pe baza punctului izoelectric al fiecărei proteine, aceasta putându-se realiza prin crearea unui gradient de pH al mediului.

Proteinele sunt amfoliți cu o încărcătură netă dependentă de pH, pozitivă la pH-ul inferior punctului izoelectric şi negativă la un pH superior. În această variantă de separare, proteinele se distribuie într-o soluție cu gradient de pH, se aplică un potențial electric de-a lungul gradientului, anodul fiind situat la capătul în care pH-ul este de valoare mică *(Figura 11.2)*.

Moleculele din zona cu pH scăzut (încărcate pozitiv) vor migra spre catod. Mişcarea lor va traversa zonele de pH cu valori ridicate şi ca o consecință vor pierde gradat sarcina lor pozitivă, iar viteza lor de migrare va scădea. Invers, moleculele din zona cu pH crescut (încărcate negativ) vor migra prin zona de descreştere a pH-lui spre anod. Când fiecare proteină va ajunge într-o poziție unde pH-ul va egala punctul său izoelectric, îşi va pierde sarcina şi migrarea va fi nulă: moleculele se vor "focaliza" la

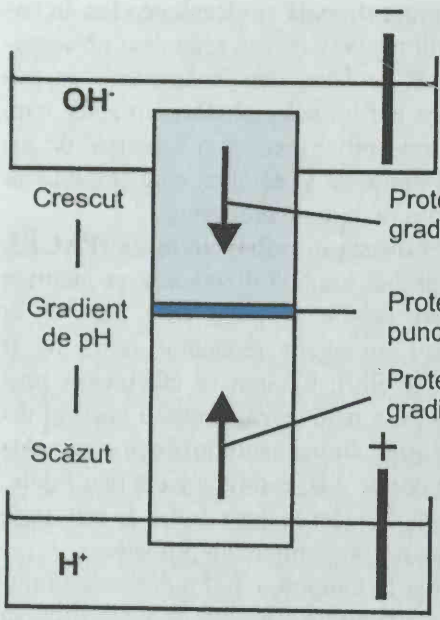


Figura 11.2. Schema migrării în electroforeza cu focalizare izoelectrică.

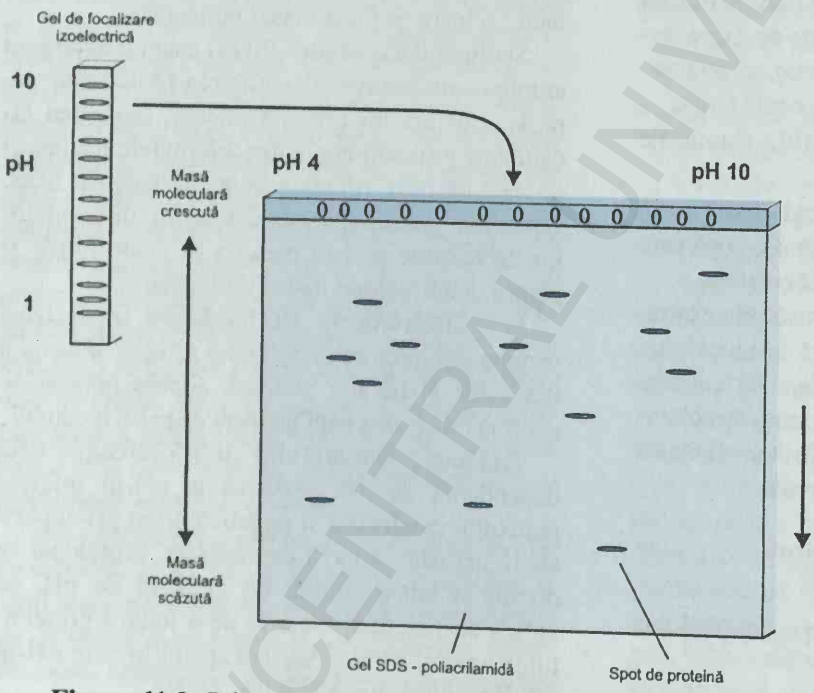


Figura 11.3. Schema migrării în electroforeza bidimensională

punctul izoelectric propriu. Amestecul se va separa complet când fiecare component va ajunge la punctul său izoelectric, iar valorile punctelor izoelectrice se vor putea măsura. Rezultatul focalizării izoelectrice constă în concentrarea proteinelor în raport cu punctele lor izoelectrice şi în posibilitatea separării compuşilor cu diferenţe foarte mici de încărcătură.

Gradientul de pH se realizează cu amfoliţi purtători, (molecule mici amfotere), cu o capacitate crescută de tamponare în jurul punctelor lor izoelectrice. La aplicarea voltajului, amfoliţii cu punctul izoelectric scăzut şi cu mai multe sarcini negative vor migra spre anod, iar ceilalţi spre catod. Cei cu valori între extremele punctelor izoelectrice vor tampona mediul la un pH corespunzător, în aşa fel încât să se creeze un gradient continuu de pH.

Electroforeza cu focalizare izoelectrică are un principiu de operare care anulează efectele difuziei, care în alte variante răspund de lărgirea benzilor. Orice proteină care va difuza în afara benzii focalizate intră într-o regiune cu un pH diferit, care îi va da o încărcătură, iar o forţă electroforetică va tinde să o aducă înapoi în banda focalizată.

Electroforeza bidimensională *(Figura 11.3)* este o tehnică hibridă în care se cuplează două modalităţi de separare, al căror sens de migrare sunt perpendiculare una faţă de cealaltă. În prima dimensiune proteinele se separă în raport cu punctele lor izoelectrice folosind electroforeza cu focalizare izoelectrică, iar în cea de a doua în raport cu masele lor moleculare, folosind electroforeza în poliacrilamidă cu sodiu dodecilsulfat. După colorare, rezultatul apare sub forma unui număr de spoturi distribuite bidimensional.

Detectarea se efectuează prin colorare, radiomarcare şi identificarea prin spectrometrie de masă şi analiză computerizată. Mii de proteine se pot separa pe un singur gel, reprezentând o mare parte a proteinelor dintr-o probă. Comparând imaginile de pe gelurile diferitelor probe, se pot găsi şi apoi identifica proteine care pot fi cruciale în procesele fundamentale ale vieţii şi în evoluţia bolilor. Electroforeza bidimensională dă informaţii pe care separările pe coloană nu le pot oferi: masă moleculară, p_i, izoforme ale proteinei intacte.

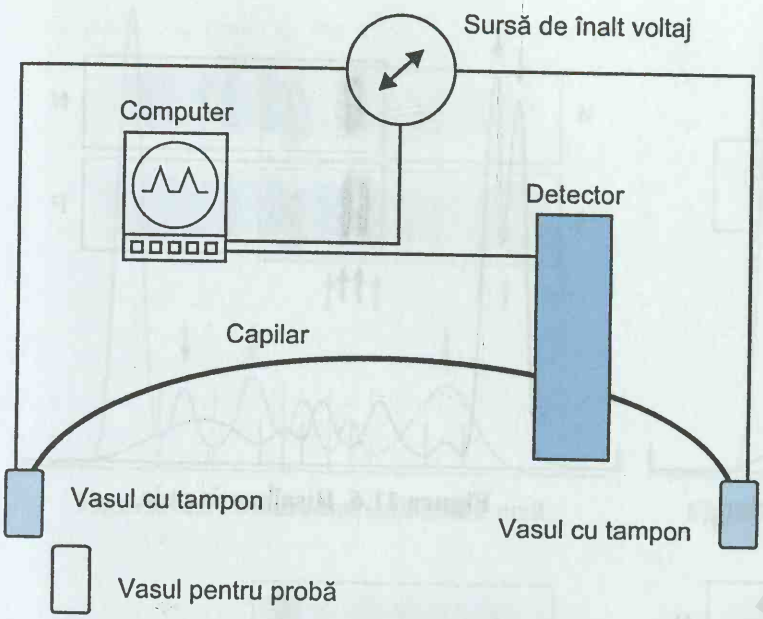


Figura 11.4. Schema unei instalaţii de electroforeză capilară

Electroforeza capilară este o variantă de electroforeză introdusă recent – metodă care îmbină mecanismele de separare ale electroforezei, cu concepţiile de instrumentar şi automatizare ale cromatografiei. În acest sens, această metodă este superioară prin următoarele:

- este automatizată, rapidă şi versatilă;
- utilizează cantităţi minime de probă
- este cantitativă, detectând limitele cele mai joase din domeniul cercetării (celulă, moleculă).

Aparatura *(Figura 11.4)* constă din capilare din silicagel căptuşite cu poliamidă (diametrul 25-75 μm) care pot transmite lumina UV. Capilarele au rezistenţă la voltaj crescut (10-30 kV) şi la câmpuri electrice de intensitate ridicate (100 – 500 Vcm^{-1}). Temperatura trebuie menţinută constantă în timpul migrării pentru a asigura precizie şi reproductibilitate. Câmpul electric crescut reduce considerabil timpul de analiză, fără a compromite eficienţa şi corectitudinea separării.

Suprafeţele de silicagel conţin grupări silanol încărcate negativ la un pH peste 3,5 care determină fenomenul de electroendosmoză. La pH scăzut, electroendosmoza este suprimată prin reducerea sarcinilor negative ale grupărilor silanol.

Capilarul umplut cu tampon care conduce curentul are capetele introduse în rezervoarele de tampon. Electrozii formaţi din material inert (Pt) sunt introduşi în tampon pentru a completa circuitul electric. Capilarul trece intermediar printr-o instalaţie optică a unui detector, un dispozitiv de introducere a probei şi o sursă de înalt voltaj.

Se injectează proba la unul din capetele capilarului, se aplică voltajul, ionii probei se deplasează spre electrodul corespunzător trecând prin detector, care răspunde cu o înregistrare a componenţilor separaţi în timp, respectiv cu o electroforegramă. Detectarea se efectuează prin absorbţie în UV.

Electroforeza capilară poate fi zonală, în gel (când implică un efect de sitare moleculară), cu focalizare izoelectrică etc. Această metodă emite rezultatele unul câte unul, spre deosebire de celelalte variante electroforetice, dar acest impediment se compensează cu timpii scurţi de separare.

11.1.4 Interpretarea anomaliilor majore observate la electroforeza proteinelor serice

Proteinele serice sunt compuse din albumine şi globuline. Cele mai multe molecule de globuline sunt mult mai mari ca albumina, deşi cantitatea totală de albumină în ser este în mod normal similară sau uşor mai mare decât nivelul globulinelor. Albumina este importantă în menţinerea presiunii oncotice serice şi acţionează ca o proteină de transport pentru unele medicamente şi multe alte substanţe. Globulinele au atribuţii mult mai variate decât albuminele: transportă substanţe, formează sistemul de anticorpi, sistemul proteinelor de coagulare, al complementului şi al proteinelor de fază acută (*vezi Capitolul 10.4.6*).

Electroforeza, care separă moleculele pe baza încărcăturii electrice a anumitor configuraţii atomice structurale, este capabilă să subdividă globulinele doar în fracţiuni, nu în proteine individuale. Nomenclatura proteinelor serice derivă din fracţiunile electroforetice a globulinelor serice, anume α (α_1 şi α_2), β (β1 şi β2) şi γ, corespunzător mobilităţii electroforetice *(Figura 11.5)*.

Electroforeza rămâne testul de screening cel mai mult folosit pentru detectarea anomaliilor proteinelor serice.

11.1.4.1 Modificări ale fracţiunii albuminice

1. Bisalbuminemia (prezenţa de bandare dublă) *(Figura11.6)* permanentă sau tranzitorie.
2. Bisalbuminemia poate fi:

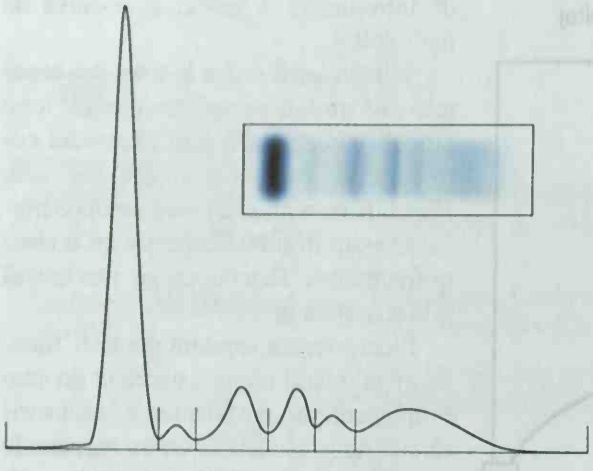


Figura 11.5. Electroforeza proteinelor serului uman normal.

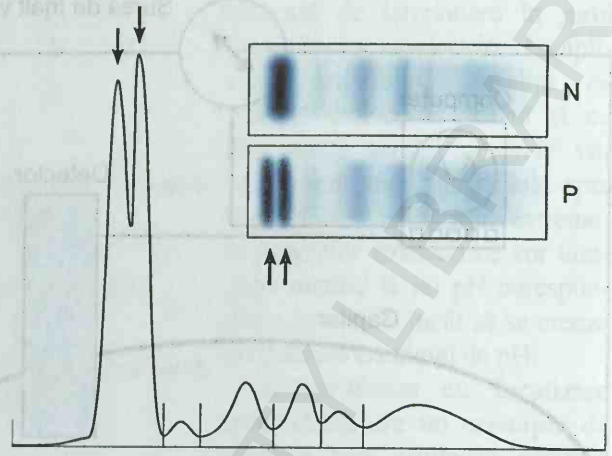


Figura 11.6. Bisalbuminemia

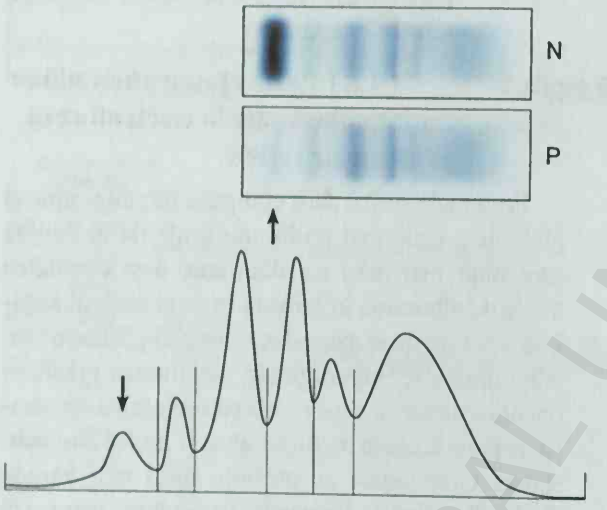


Figura 11.7. Analbuminemie congenitală

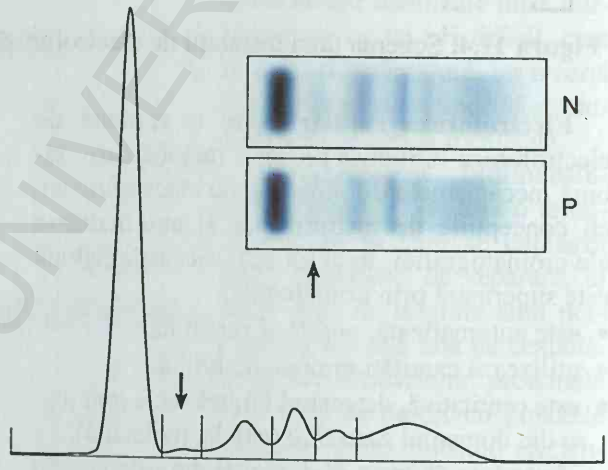


Figura 11.8. Deficienţă congenitală de α1-antitripsină

a. Ereditară, când bandarea dublă este semnul unei variante genetice fără vreun efect patologic.

b. Dobândită, fie prin fixarea pe albumină în cantitate mare a antibioticelor utilizate în tratarea insuficienţei renale, fie în fistule pancreatice prin liza albuminei de către enzimele pancreatice.

3. Absenţa aproape completă a benzii: analbuminemie congenitală *(Figura 11.7)*, când apar edeme discrete.

4. Hipoalbuminemie de origine hepatică în:

a. deficienţă nutriţională;

b. descreşterea vitezei de sinteză: insuficienţă hepatocelulară, inflamaţie;

c. pierdere urinară, digestivă, cutanată;

d. hipercatabolism: tulburări endocrine dobândite, sindroame inflamatorii acute.

5. Hiperalbuminemie fără importanţă patologică care se poate observa în cazul hemoconcentraţiei sau în cazul perfuziilor cu albumină.

11.1.4.2 Modificări ale zonei α_1 globulinei

1. Descreşteri în:

a. insuficienţă hepatocelulară, malnutriţie sau pierdere de proteine, de obicei cu descreştere de albumină, α_2 şi β globuline;

b. deficienţă congenitală de α_1-antitripsină *(Figura 11.8)*.

2. Creşteri în tulburări inflamatorii asociate cu creşterea α_2 globulinei datorită localizării proteinelor de fază acută (orosomucoid şi $\alpha_1$antitripsină) din zona α_1 şi a haptoglobinei din zona α_2 globulinelor. Această patologie reflectată prin

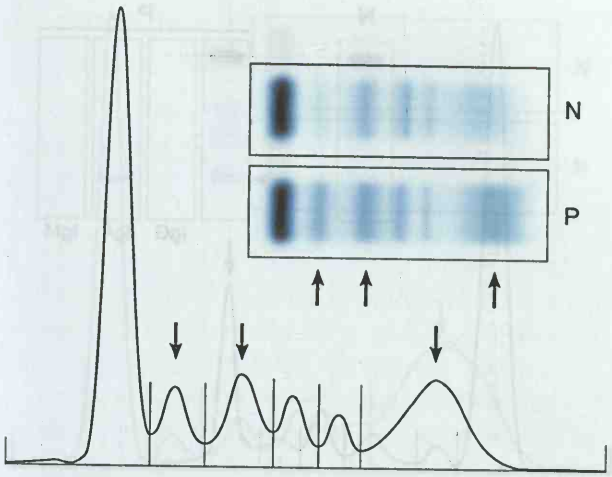


Figura 11.9. Sindromul inflamator acut.

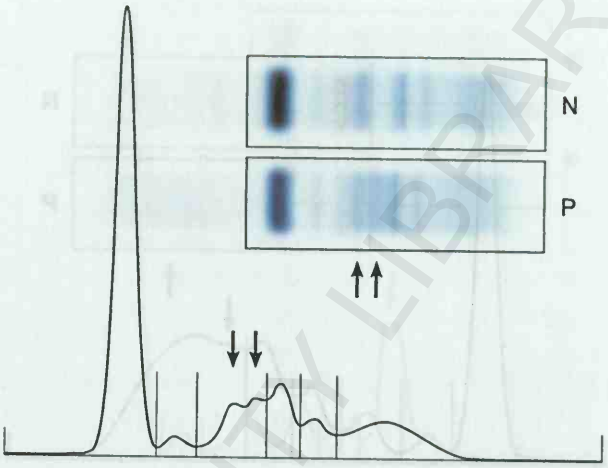


Figura 11.10. Dublă bandare a zonei α_2 prin hemoliză

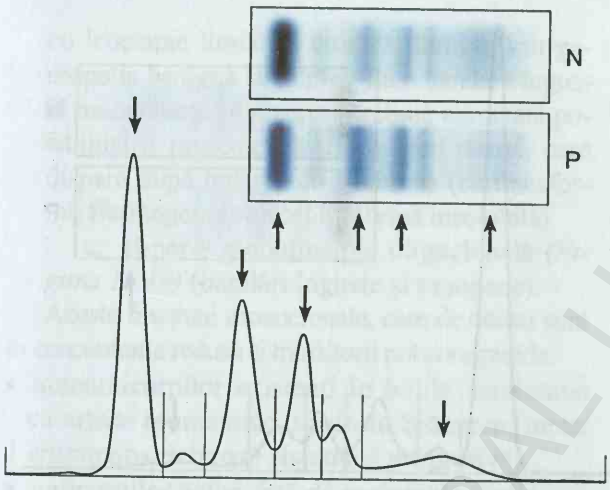


Figura 11.11. Sindrom nefrotic

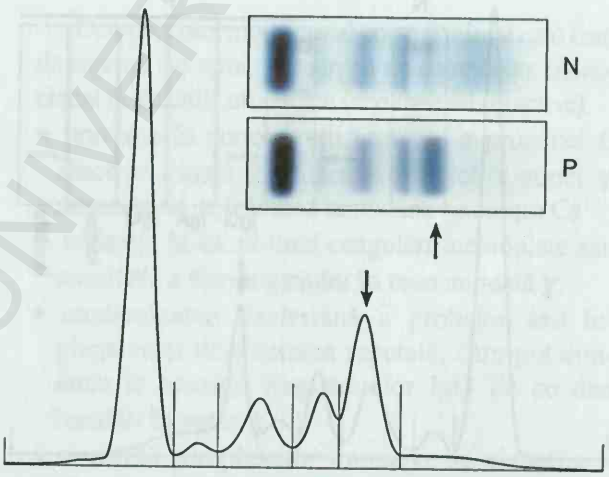


Figura 11.12. Hipertransferinemia în anemie – intensificarea zonei β

migrarea electroforetică poartă numele de "sindromul inflamator acut" *(Figura. 11.9)*.

11.1.4.3 Modificări ale zonei α_2 globulinelor

1. Duble bandări în cazurile:
   a. Hemoliza serului *(Figura 11.10)*
   b. Prezența fenotipurilor de haptoglobină ce prezintă o mobilitate electroforetică diferită față de a haptoglobinei obişnuite. Aceste fenotipuri, însă nu indică o stare patologică.
   c. Prezența β lipoproteinei cu o mobilitate electroforetică α_2 anormală.
   d. Prezența unui component monoclonal (sau lanț uşor liber).
2. Descreşteri apar în:
   a. Insuficiență hepatocelulară, malnutriție sau pierdere de proteine.
   b. Hemoliză intravasculară.
3. Creşteri în:
   a. Sindrom inflamator asociat cu hiper α_1.
   b. Sindrom nefrotic *(Figura 11.11)* asociat cu creşterea α_2 şi cu hipoalbuminemie (prin pierdere de urină), hiper β şi hiper proteinurie.

11.1.4.4 Modificări ale zonei β

1. Descreşteri:
   a. Induse de insuficiența hepatocelulară, malnutriție sau pierderea de proteine legate de o descreştere a transferinei care migrează în zona β_1.
   b. Hipocomplementemie indusă de consumul C_3 asociată cu o descreştere a β_2; dispariția fracțiunii β_2 este legată de "vârsta" serului care nu a fost supus imediat electroforezei.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

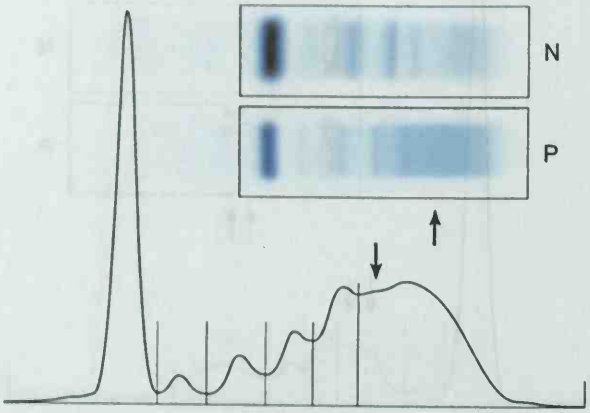


Figura 11.13. Pod β – γ în ciroza alcoolică.

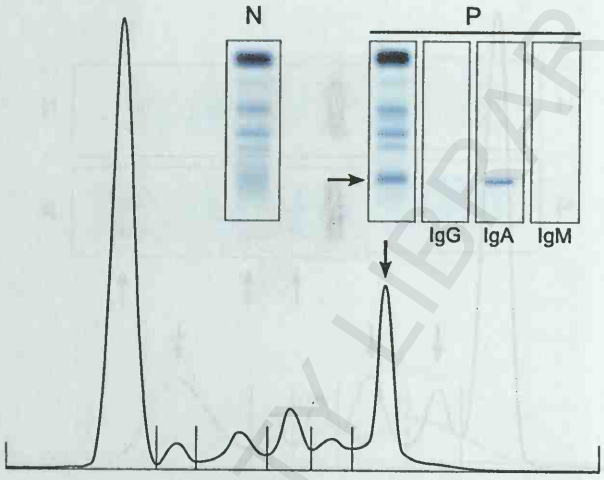


Figura 11.14. Proteină IgA monoclonală

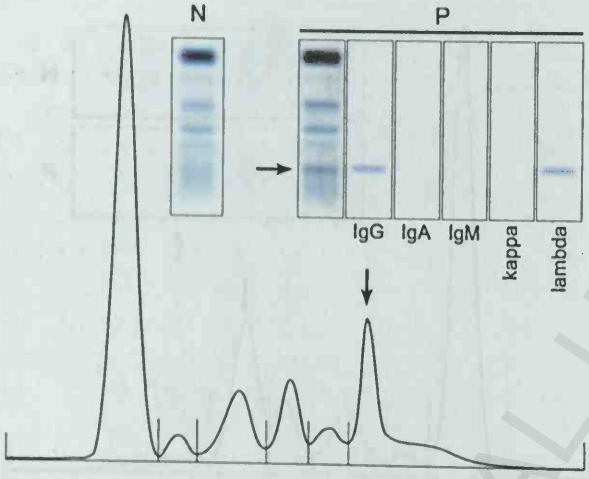


Figura 11.15. Boala lanţurilor uşoare

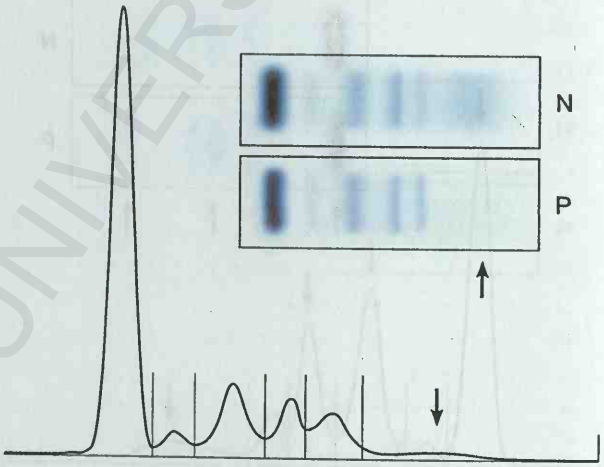


Figura 11.16. Hipo -γ globulinemie

2. Creşteri se pot întâlni:

a. Hipertransferinemia *(Figura 11.12)* în anemie sau prin creşterea β lipoproteinelor. Plasma conţine fibrinogen pe lângă proteinele serice obişnuite, fibrinogenul fiind o beta globulină. Se va evita electroforeza proteinelor din plasmă pentru a elimina potenţiala confuzie cu gradientele monoclonale localizate în zona beta.

b. Hiper β_2 prin hiper C_3: în sindromul inflamator sau hiper β_2 datorită obstrucţiei intra- sau extrahepatice.

c. β crescut sau pod β – γ în ciroza alcoolică *(Figura 11.13)*.

d. Proteine monoclonale: IgA *(Figura 11.14)*, IgG în mielom, IgM în boala Waldenström, sau lanţuri uşoare libere *(Figura 11.15)*, în mielom Bence Jones (boala lanţurilor uşoare) sau amiloidoză.

11.1.4.5 Modificări în zona γ

1. Hipo - γ globulinemie *(Figura 11.16)* ce se întâlneşte :

a. La nou- născuţi

b. Imunodeficienţă izolată sau totală primară (implicând toate cele trei clase de imunoglobuline) la copii sau la adulţi.

c. Secundară datorită corticosteroizilor, tratamentului cu imunosupresoare, chimioterapie sau radioterapie.

d. Mielom multiplu - prezenţa proteinei Bence Jones în urină

2. Hiper - γ globulinemie poate fi:

a. Policlonală *(Figura 11.17)* în infecţii hepatice, HIV sau boli autoimune

b. Monoclonală (bandare îngustă şi omogenă) în mielom sau boală Waldenström, asocierea

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

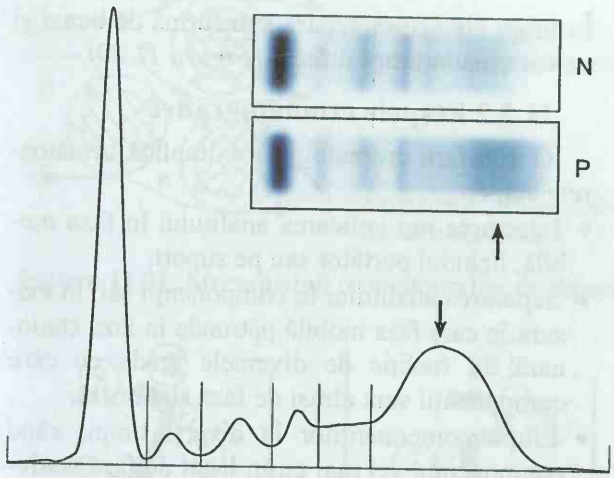


Figura 11.17. Hiper γ globulinemie

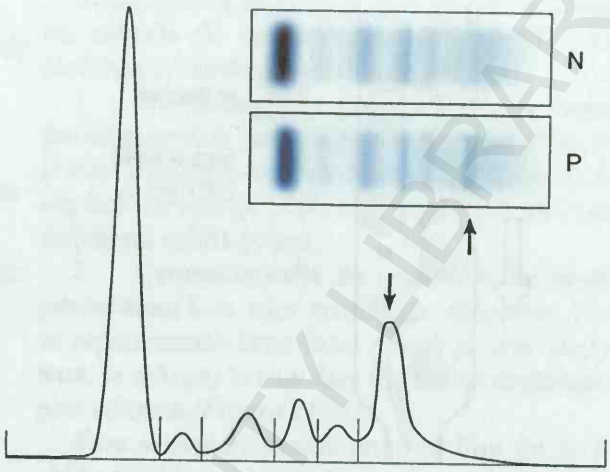


Figura 11.18. Hiper – γ globulinemie oligoclonală

cu leucemie limfatică cronică, limfom sau gamopatie benignă la bătrâni. La o bandare îngustă monoclonală din zona γ trebuie eliminată posibilitatea prezenţei de fibrinogen rămas, care dispare după tratarea cu trombină (ce transformă fibrinogenul solubil în fibrină insolubilă).

c. Hiper-γ globulinemie oligoclonală *(Figura 11.18)* (bandări înguste şi omogene).

Aceste fracţiuni monoclonale, care de obicei sunt în concentraţie redusă şi tranzitorii pot corespunde:

- autoanticorpilor existenţi în bolile autoimune ca artrite reumatoide, sindrom Sjöngren, lupus eritematos, scleroză sistemică progresivă;
- anticorpilor activi faţă de proteinele virale: indivizi seropozitivi HIV, hepatite virale, meningite, infecţii cu virus citomegalic;
- răspunsurilor autoimune la pacienţi transplantaţi sub terapie imunosupresoare;
- răspunsurilor imune la subiecţi sănătoşi, fără nici o valoare.

Electroforeza proteinelor serice poate prezenta unele limite datorate tipului de electroforeză folosit, a pregătirii preanalitice incorecte a probei supuse separării sau a prezenţei diverşilor componenţi din amestecul de separat.

Componentul monoclonal poate fi omis în următoarele situaţii (rezultate fals negative):

- comigrarea cu o altă fracţiune proteică;
- includerea într-o crioglobulină sau în cheagul de fibrină şi pierderea prin centrifugare
- polimerizarea în complexe mari (lanţ greu α în boala lanţurilor grele) şi vizualizare sub forma unei pete difuze, diferite de o bandare îngustă bine delimitată.

Componentul monoclonal poate fi mimat cu o bandă care nu are nimic comun cu un component monoclonal în situaţiile următoare (rezultate fals pozitive):

- prezenţa în concentraţii crescute a proteinei C reactive situată la extrema catodică a zonei γ, atunci când se folosesc tampoane ce conţin Ca^{2+};
- prezenţa în cazul unei coagulări incomplete sau anormale a fibrinogenului în zona anodală γ;
- contaminarea bacteriană a probelor sau înghețarea şi dezgheţarea repetată, care pot conduce la apariţia fragmentelor IgG Fc ce dau bandări în zona γ;
- prezenţa complexelor imune ce se vizualizează prin una sau mai multe bandări (IgM monoclonal factor reumatoid complexat cu IgG policlonal – crioglobuline de tip II);
- prezenţa de proteine ne - imunoglobulinice (transferină, factorul 3 al complementului).

11.2 Cromatografia

11.2.1 Principiu

Cromatografia este metoda prin care componenţii chimici prezenţi în amestecuri complexe sunt separaţi, identificaţi şi determinaţi. Această metodă constituie cea mai importantă modalitate de separare a biomoleculelor. Clasic, cromatografia este tehnica prin care componenţii unui amestec sunt separaţi pe baza vitezelor cu care sunt transportaţi sau deplasaţi spre o fază staţionară (lichidă sau solidă) de către o fază mobilă (lichid sau gaz) *(Figura 11.19)*.

Presupunem că avem un amestec de doi componenţi A şi B incluşi într-o soluţie tampon.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

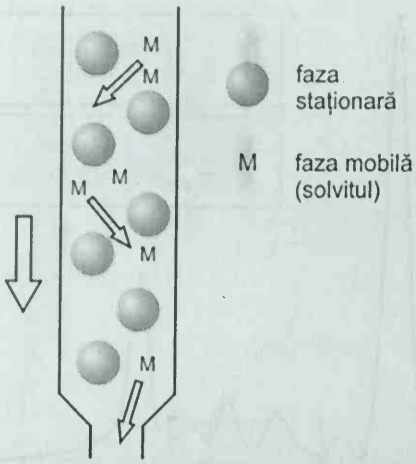


Figura 11.19. Evoluţia unei cromatografii pe coloană

Coloana este umplută cu o substanţă insolubilă, la care se vor lega diferenţiat şi reversibil de componenţii amestecului A şi B. Iniţial, coloana se echilibrează prin trecerea unui volum de tampon, iar amestecul de separat se aplică la partea superioară a coloanei sub forma unui strat îngust. Stratul de solviţi va trece prin coloană şi se vor spăla pe măsură ce se introduce tamponul de soluţie. Acest proces se numeşte eluţie şi soluţia culeasă la baza coloanei este eluatul. Aşa cum se vede şi din *Figura 11.20,* componentul B este mai strâns legat de matriţă decât A. Astfel, când amestecul va parcurge coloana, moleculele componentului B vor fi mai întârziate faţă de moleculele componentului A. În timp, ele se vor separa sub formă de benzi şi se vor elua la timpi diferiţi *(Figura 11.20).*

11.2.2 Etapele cromatografiei

O separare cromatografică implică următoarele etape:

- Injectarea sau aplicarea analitului în faza mobilă, lichidul purtător sau pe suport.
- Separarea analitului în componenţii săi, în măsura în care faza mobilă pătrunde în faza staţionară, în funcţie de diversele grade cu care componenţii sunt atraşi de faza staţionară.
- Eluţia componenţilor la diverşi timpi, când componentul cel mai puţin legat de faza staţionară se separă primul.
- Detectarea, în care componenţii sunt analizaţi prin măsurarea unor proprietăţi ale lor (de ex. indicele de refracţie, absorbanţă în UV etc).
- Finalizarea analizei cromatografice printr-o cromatogramă, care apare ca o reprezentare grafică, în care componenţii separaţi se vizualizează sub formă de fracţiuni.

Mişcarea moleculelor este determinată de balanţa dintre două forţe:

- forţa de împingere a fazei mobile care transportă cu ea moleculele pentru care are afinitatea favorizată de solubilitate sau volatilitate;
- forţa de frânare a fazei staţionare care se opune şi menţine moleculele cu care interacţionează.

Echilibrul între forţe este diferit pentru diversele molecule, aceasta conducând la mobilităţi diferite, deci la separarea componenţilor.

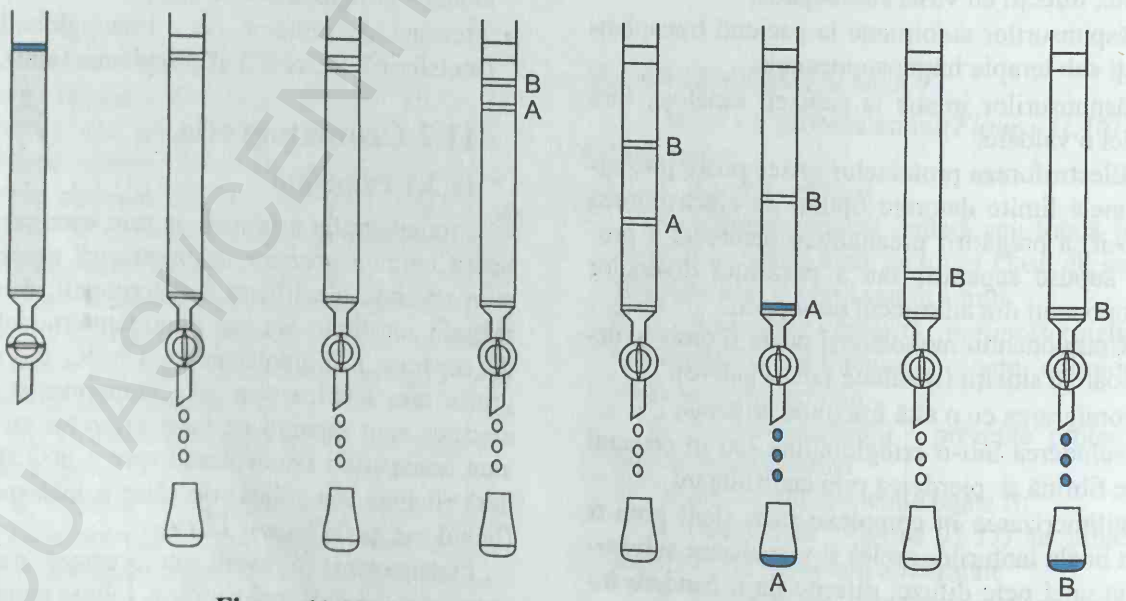


Figura 11.20. Schema separării cromatografice pe coloană

BCU IAŞI/CENTRUL UNIVERSITAR

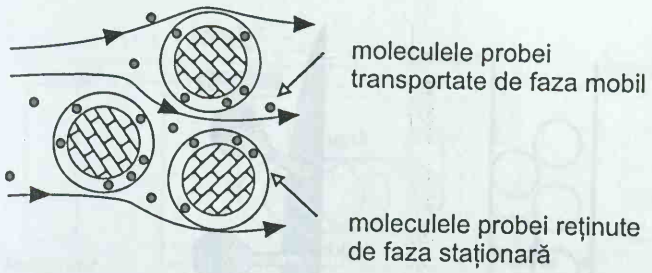


Figura 11.21. Mecanismul cromatografiei de repartiţie

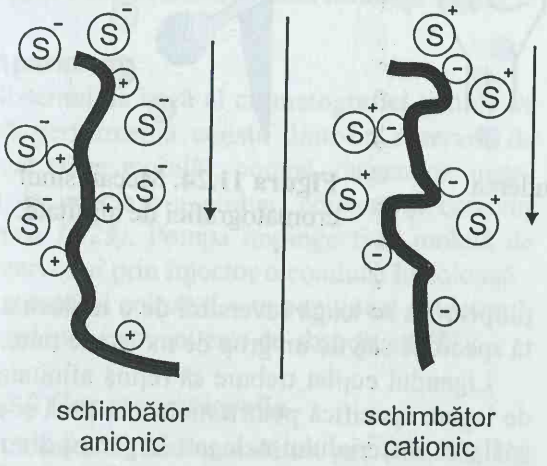


Figura 11.22. Mecanismul cromatografiei schimbătoare de ioni. S = solvit

11.2.3 Clasificarea metodelor cromatografice

În funcţie de plasarea fazei staţionare pe un suport, metodele cromatografice se clasifică în două mari categorii:

- **Cromatografia pe coloană**
- **Cromatografia planară**

11.2.3.1 Lichid cromatografia / lichid cromatografia de înaltă performanţă (HPLC)

La început, lichid cromatogafia se efectua în coloane de sticlă cu diametre mari, la fel erau şi diametrele particulelor fazei staţionare (150 - 200μ). Timpul de eluţie a fazei mobile ce conţinea analitul era lent, iar timpii de separare deseori atingeau câteva ore. Introducându-se tehnologia modernă, diametrele particulelor fazei solide s-au redus la 10 μ , iar coloanele de sticlă au fost înlocuite cu cele de oţel. Viteza de curgere a fazei mobile s-a îmbunătăţit, aplicându-se coloanei presiune înaltă, ceea ce a dus la creşterea semnificativă a performanţei analizei. Această nouă formă a tehnologiei de separare a luat numele de cromatografie de înaltă performanţă în lichid.

După natura proceselor care au loc în coloană, metoda de cromatografie lichidă de înaltă performanţă se împarte în 5 categorii :

1. **Cromatografia de adsorbţie de înaltă performanţă** în care analitul este adsorbit pe suprafaţa unei faze solide polare. Natura adsorbţiei implică interacţia moleculelor polare cu faza staţionară solidă polară.
2. **Cromatografia de repartiţie de înaltă performanţă** în care analitul se distribuie (sau se repartizează) între faza mobilă şi faza staţionară, în măsura în care faza mobilă se deplasează prin coloană *(Figura 11.21)*.

Faza staţionară constă dintr-un film fin de lichid adsorbit sau legat chimic de suprafaţa particulelor solide fin divizate, care nu se îndepărtează prin încălzire sau reacţie.

3. **Cromatografia de schimb ionic de înaltă performanţă** în care faza staţionară constă dintr-o răşină polimer, care are fixate pe suprafaţa sa grupări ionice şi se denumeşte „răşină schimbătoare de ioni" *(Figura 11.22)*. Aceasta poate fi răşină schimbătoare de anioni, care posedă grupări încărcate pozitiv, pentru a atrage ionii negativi, sau răşină schimbătoare de cationi, care posedă grupări încărcate negativ pentru a atrage ionii pozitivi. Analitul care conţine un amestec de ioni se introduce în coloana umplută cu răşina schimbătoare de ioni care selectează ionii ce se vor ataşa sau fixa pe ea, astfel separându-se de alte specii ce nu suferă acest proces. Ulterior, ionii ataşaţi se pot disloca din coloană prin eluţii repetate cu o soluţie ce conţine un ion care are o mai mare afinitate pentru grupările încărcate pe răşină decât ionii analitului. Astfel, ionii analitului sunt supuşi schimbului ionic şi se separă din coloană.
4. **Cromatografia de înaltă performanţă prin excluderea mărimii particulelor** *(Figura 11.23)* în care faza staţionară este o răşină polimer cu pori mici. Componenţii din amestecul de separat trec prin coloană şi particulele mici intră în porii fazei staţionare, mobilitatea lor fiind diminuată. În acelaşi timp, însă, particulele mari, care nu pot pătrunde în aceşti pori pot ieşi rapid din coloană şi se eluează primele.

Separarea prin variaţia mărimii particulelor se clasifică în două categorii care se bazează pe natura fazei staţionare şi a fazei mobile:

- *Cromatografia prin filtrare în gel* care foloseşte umpluturi hidrofilice şi faze mobile foarte apoase, pentru a separa specii polare.

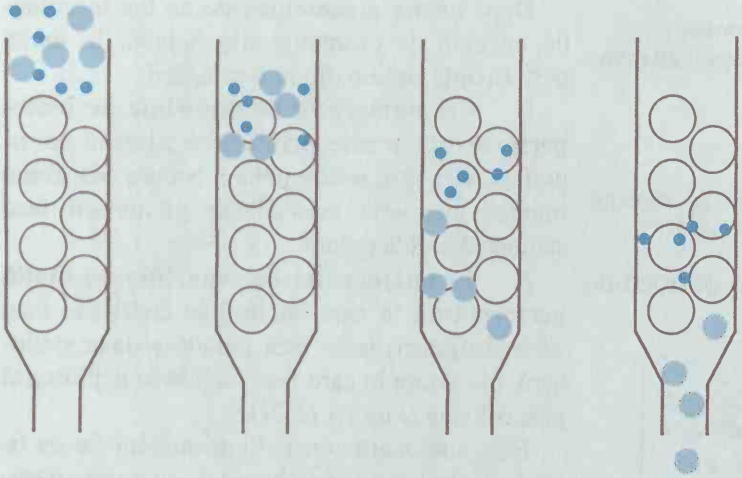


Figura 11.23. Mecanismul cromatogafiei prin excluderea mărimii particulelor deplasate

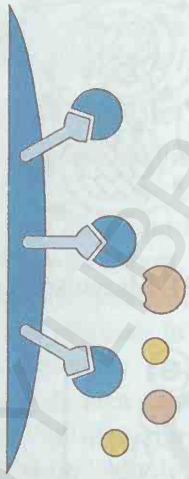


Figura 11.24. Mecanismul cromatografiei de afinitate.

- *Cromatografia prin penetraţie în gel* care foloseşte umpluturi hidrofobice şi faze mobile ca solvenţii organici nepolari, pentru a separa specii nepolare.

5. **Cromatografia de afinitate** separă analiţii pe baza unei interacţii biospecifice reversibile între component (sau grup de componenţi) şi un ligand specific cuplat cu o matriţă cromatografică *(Figura 11.24)*. Această tehnică prezintă o selectivitate crescută, deci şi o rezoluţie înaltă. Interacţiunile biologice între ligand şi molecula ţintă pot fi un rezultat al atracţiilor electrostatice sau hidrofobice, forţe Van der Waals şi/sau fixare de hidrogen. Pentru a elua molecula ţintă din mediul de afinitate se poate inversa interacţia, fie prin folosirea unui ligand competitiv sau prin unul nespecific, modificând pH-ul, puterea ionică sau polaritatea. Faza staţionară constă dintr-o matriţă inertă chimic sau fizic, pe care ligandul propriu-zis se leagă reversibil de o moleculă ţintă specifică sau de un grup de molecule ţintă.

Ligandul cuplat trebuie să reţină afinitatea sa de legare specifică pentru molecula ţintă şi după spălarea materialului nelegat. Legătura dintre ligand şi molecula ţintă trebuie să fie reversibilă, pentru a permite celei din urmă să fie îndepărtate în forma activă.

Tehnica de cromatografie de afinitate începe cu echilibrarea mediului de afinitate în tamponul de legare. Se aplică proba care se leagă specific, dar reversibil de ligand, iar substanţa nelegată se spală. Substanţa ţintă se recuperează prin schimbarea condiţiilor care să favorizeze eluţia. Eluţia se face specific, cu un ligand competitiv sau nespecific, modificând pH-ul, puterea ionică sau polaritatea. Substanţa ţintă se colectează într-o formă concentrată, purificată. Final, mediu de afinitate se rechilibrează cu tamponul de legare.

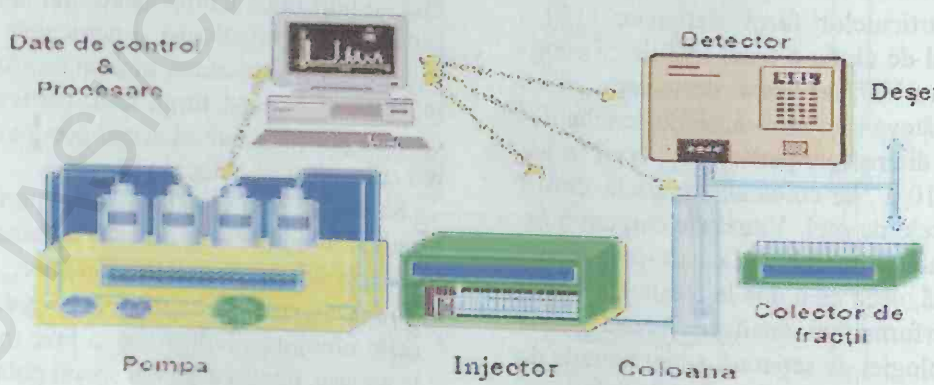


Figura 11.25. Schema de bază a instalaţiei de cromatografie pe coloană.

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

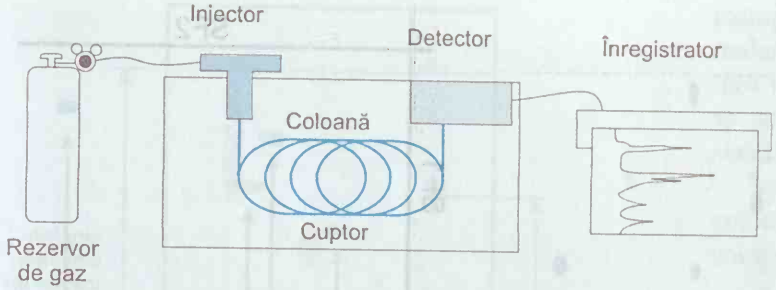


Figura 11.26. Schema unei instalaţii de gaz cromatografie.

Aparatura

Sistemul de bază al cromatografiei lichide de înaltă performanţă constă dintr-un rezervor de solvent (faza mobilă), pompă, degazator, instalaţie de injectare a probei, coloană şi detector *(Figura 11.25)*. Pompa împinge faza mobilă de la rezervor şi prin injector o conduce în coloană.

La capătul coloanei este poziţionat detectorul, care cel mai frecvent este de absorbţie în UV.

11.2.3.2 Gaz cromatografia

Foloseşte ca fază mobilă un gaz (He, N_2, H_2, Ar, etc) care transportă amestecul de separat de-a lungul fazei staţionare. Această tehnică se clasifică funcţie de tipul fazei staţionare, în două tipuri:

- **Cromatografia gaz - solid** în care faza staţionară este solidă, cu o mare suprafaţă în care se adsorb componenţii din amestec. Separarea componenţilor se bazează pe diferenţele puterii de adsorbţie şi difuzie a moleculelor gazoase ale analitului.
- **Cromatografia gaz – lichid** în care faza staţionară este un lichid ce este imobilizat prin adsorbţie sau fixare chimică pe suprafaţa unui suport solid. Separarea componenţilor din amestec are loc datorită raportului de distribuţie (partiţie) a acestora, între faza gazoasă şi faza lichidă imobilizată.

Aparatura

Aparatura folosită în gaz cromatografie diferă de cea folosită pentru cromatografia lichidă prin faptul că instalaţia de injectare, coloana şi detectorul sunt încălzite la o temperatură pre-specificată. Faza mobilă fiind un gaz, componenţii din analit trebuie să fie vaporizaţi. Componentele de bază a unui gaz cromatograf includ *(Figura 11.26)*: un cilindru de gaz purtător cu regulator, un controlor de flux pentru gaz, instalaţia de injectare pentru introducerea probei, coloana, detectorul şi înregistratorul.

Detectorii folosiţi în gaz cromatografie generează semnalul electronic, când un gaz, altul decât gazul purtător, eluează componenţii din coloană. Astfel, există mai multe tipuri de detectori:

- Detectorul cu conductibilitate termică, în care gazul eluent are o conductibilitate termică diferită de a gazului purtător.
- Detectorul cu ionizare în flacără, potrivit căruia efluentul coloanei trece printr-o flacără de hidrogen şi componenţii inflamabili sunt arşi. O parte din molecule sunt fragmentate în specii încărcate pozitiv şi negativ. În timp ce ionii pozitivi sunt conduşi în colector, ionii negativi sunt atraşi către capătul arzător încărcat pozitiv, acesta generând un circuit electric şi semnalul este amplificat. Acest detector este foarte sensibil, dar distruge proba prin ardere.
- Detectorul cu captură de electroni, foloseşte emisiile β ale unei surse radioactive, pentru ionizarea moleculelor gazului purtător, generând astfel electroni, care dau naştere unui curent electric.
- Detectorul cu azot / fosfor, care are o sare de metal alcalin poziţionată peste flacără şi este analog celui cu conductibilitate termică.
- Detectorul flamfotometric care conţine încorporat un flamfotometru. Compuşii cu sulf sau fosfor ard în flacăra de hidrogen şi produc specii care emit lumină.
- Detectorul cu conductibilitate electrolitică, care converteşte componenţii gazoşi eluaţi în ioni, în soluţie lichidă şi apoi măsoară conductibilitatea electrolitică a soluţiei, într-o celulă de conductibilitate. Conversia la ioni are loc prin oxidare chimică sau prin reducere cu un "gaz reacţie".

În cromatografia pe coloană, ca şi în gaz cromatografie se foloseşte uneori derivatizarea în precoloană, proces ce modifică chimic moleculele testate înainte de separare. Această operaţie are ca scop detectarea mai uşoară a componenţilor separaţi şi creşterea sensibilităţii de detectare. Derivaţii cei mai frecvenţi se obţin prin introducerea în molecula test a unei grupări care să confere anumite proprietăţi care să îmbunătăţească detectarea.

Metodele de derivatizare se folosesc dacă sensibilitatea sau selectivitatea unei analize sunt nesatisfăcătoare sau inadecvate. Ele sunt utilizate pentru:

- îmbunătăţirea detecţiei şi/sau rezoluţiei
- stabilirea identităţii analitului
- îmbunătăţirea selectivităţii analiţilor într-o matrice complexă
- îmbunătăţirea comportării cromatografice
- creşterea stabilităţii şi/ sau solubilităţii.

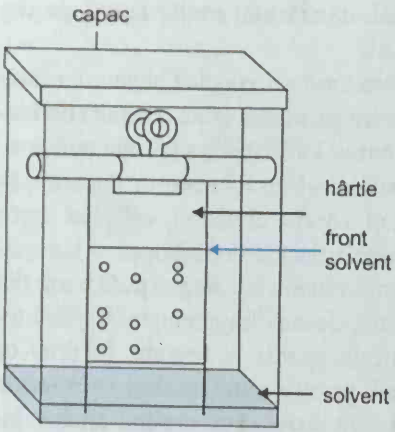


Figura 11.27. Un experiment de cromatografie pe hârtie

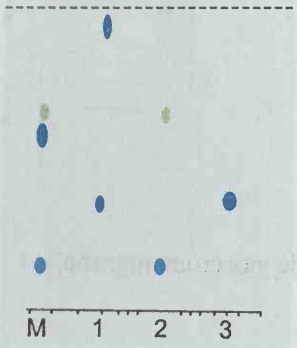


Figura 11.28. Cromatogramă monodimensională pe hârtie.

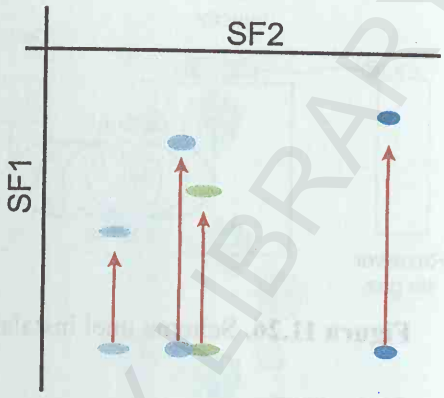


Figura 11.29. Cromatogramă bidimensională. SF1 = frontul de solvent pentru prima migrare; SF2 = frontul de solvent pentru a doua migrare.

De exemplu, aminele biogene separate prin HPLC suferă o derivatizare cu O-ftalaldehidă şi mercaptoetanol.

11.2.3.3.Cromatografia pe hârtie

Are ca fază staţionară hârtia, un foarte uniform absorbant şi se include în mecanismul de separare prin partiţie. Faza staţionară este suspendată într-un container închis, ce conţine faza mobilă care este constituită din următorul amestec: un component polar, unul ne-polar şi rar un al treilea, pentru menţinerea miscibilităţii şi a ajustării de pH *(Figura 11.27)*.

Închiderea containerului asigură saturarea mediului în care se face migrarea, pentru a se împiedica evaporarea amestecului pe măsură ce acesta avansează pe hârtie. Componenţii amestecului se deplasează cu viteze diferite, separându-se în acest fel şi final se pun în evidenţă prin colorare.

Cromatografia monodimensională pe hârtie *(Figura 11.28)* implică folosirea unui singur amestec de solvenţi, care să deplaseze proba într-o singură direcţie.

Cromatografia bidimensională *(Figura 11.29)* se aplică la compuşii care pe cromatografia monodimensională sunt foarte apropiaţi şi nu se pot separa. În acest caz se folosesc două migrări, perpendiculare ca sens, cu două amestecuri diferite de solvenţi. Separarea are loc pe baza proprietăţilor diferite de solubilizare a celor două amestecuri de solvenţi, când compuşii ce nu se puteau separa prin cromatografie monodimensională, în acest caz se separă, rezoluţia separării devenind superioară.

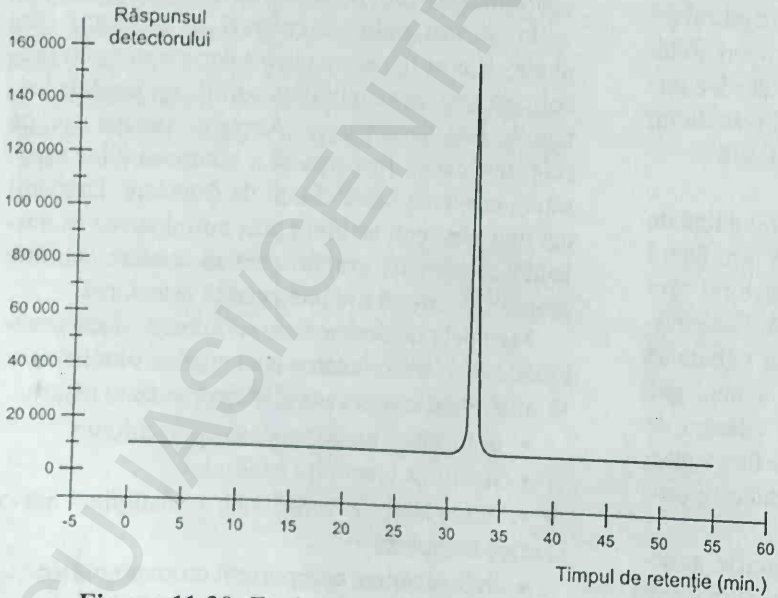


Figura 11.30. Evaluarea componentului separat prin cromatografie pe coloană.

11.2.3.4 Cromatografia pe strat subţire

Ca şi cromatografia pe hârtie, se încadrează în metodologia de separare prin partiţie şi se realizează pe un strat subţire de silicagel sau alumină (fază staţionară) repartizat uniform, care acoperă o placă de sticlă, metal sau plastic rigid. Faza mobilă constă dintr-un amestec de solvenţi, care antrenează amestecul de separat, ai cărei com-

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

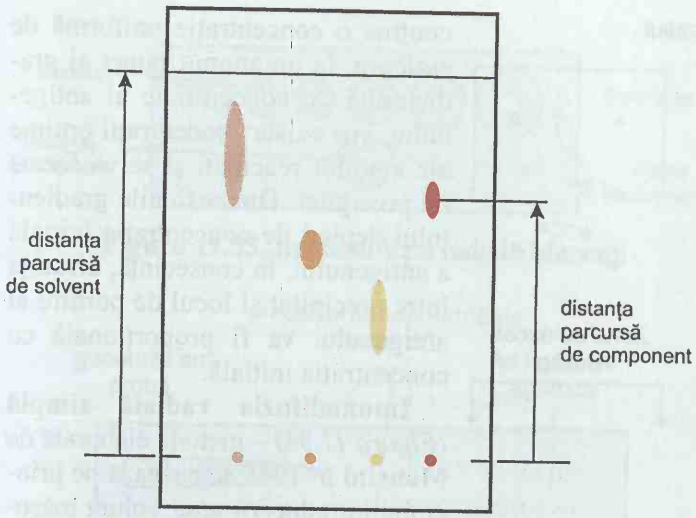


Figura 11.31. Evaluarea componenţilor separaţi prin cromatografie pe hârtie sau strat subţire

ponenţi se deplasează cu viteze diferite şi în final se separă. Procesul de separare este analog cromatografiei pe hârtie. Cromatografia pe strat subţire poate fi şi bidimensională.

11.2.4 Evaluarea rezultatelor separării cromatografice - Analiza calitativă

Identificarea componenţilor separaţi prin cromatografia pe coloană (lichidă şi gazoasă), se efectuează după timpul corespunzător de retenţie, comparativ cu cel al standardelor ce migrează în condiţii identice cu probele *(Figura 11.30)*.

În acelaşi scop, se mai poate utiliza pentru componentele fluxului ce ies din coloană şi spectrometria de masă.

În cazul cromatografiei pe hârtie şi pe strat subţire, componenţii se evaluează prin distanţa parcursă de compus, raportată la cea parcursă de solvent, valoare denumită

R_F – mărime care caracterizează fiecare component *(Figura 11.31)*.

11.2.5 Evaluarea rezultatelor separării cromatografice - Analiza cantitativă

Evaluarea cantitativă a fiecărui component separat prin cromatografiei pe coloană (lichidă sau gazoasă) se efectuează prin reprezentarea grafică a volumului de eluat sau a timpului de eluţie în raport cu absorbanţa, care la rândul lor sunt direct proporţionali cu concentraţia corespun-zătoare. Calibrarea se face cu standarde de masă cunoscută. Trebuie menţionat că standardul intern este similar şi nu identic cu analitul ce se separă pe cromatogramă. Uneori se foloseşte în locul volumului de eluat sau a timpului de eluţie, înălţimea vârfului – mai puţin corect teoretic – care se acceptă în situaţia în care calibrarea cu standarde are loc în condiţii identice.

Instalaţiile moderne de cromatografie pe coloană permit integrarea electronică sau computerizată a semnalului.

În cazul cromatografiei pe hârtie sau pe strat subţire, se extrage spotul cu un solvent şi se analizează spectrofotometric. O altă variantă prevede scanarea densitometrică a cromato-gramei şi apoi se procedează ca şi în cazul cromatografiei pe coloană.

11.3 Metode imunologice

Reacţiile antigen-anticorp constitue baza unor metode foarte utilizate de analizele calitative şi semi-cantitative.

Anticorpii fac parte din familia imuno-globulinelor a căror denumire a derivat din observaţia că în timpul electroforezei plasmei sanguine, proteinele asociate cu activitatea anticorpică migrează cu fracţiunea gama a globulinelor.

11.3.1 Reacţia antigen-anticorp

Un anticorp (Ac) se combină specific cu antigenul (Ag) corespunzător *(Figura 11.32)*, similar cu legătura dintre o enzimă şi substratul său şi implică interacţii hidrofobe şi electrostatice. Legătura dintre Ac şi Ag nu implică o reacţie chimică ulterioară şi stabilitatea sa depinde de forma complementară a Ag-lui şi de poziţia de legare a Ac-lui. Forţele ce ţin Ag şi Ac împreună sunt relativ slabe, în consecinţă aceste combinaţii sunt reversibile şi complexul se va disocia în funcţie de puterea legăturii.

$$Ag + Ac \leftrightarrow AgAc$$

Antiserurile pot fi **policlonale** deoarece conţin anticorpi produşi de diferite limfocite. Această categorie de anticorpi reduc specificitatea metodelor imunochimice. În schimb, anticorpul **monoclonal** este produs de o clonă de plasmocite, toate derivate de la un singur limfocit.

Combinarea Ag cu Ac *(Figura 11.33)* duce la formarea unei reţele de complexe imune, care sedimentează şi se poate evalua calitativ sau cantitativ.

Dacă Ag este iniţial solubil, procesul este cunoscut ca precipitare, iar dacă Ag este celular sau special, procesul se numeşte aglutinare.

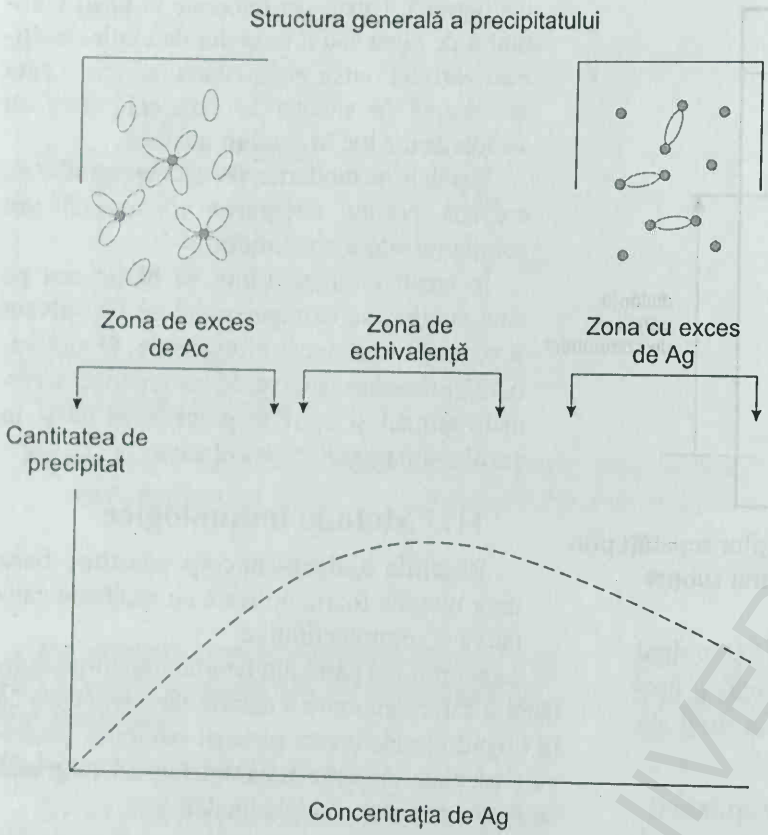


Figura 11.32. Cantitatea de precipitat format în reacţiile antigen-anticorp, în funcţie de concentraţia relativă a reactanţilor

Precipitarea maximă apare când Ag şi Ac sunt în cantităţi echivalente *(Figura 11.32* şi *Figura 11.33).* În zona de echivalenţă cantitatea de precipitat este maximă posibilă, deoarece agregatele sunt mari şi insolubile.

11.3.2 Imunoprecipitarea în gel

Gelurile stabilizează precipitatul şi dau posibilitatea măsurării sale. Dacă o concentraţie crescută de antigen difuzează într-un gel, care conţine o concentraţie uniformă de anticorp, la un anumit punct al gradientului de concentraţie al antigenului, vor exista concentraţii optime ale ambilor reactanţi şi se va forma un precipitat. Dimensiunile gradientului depind de concentraţia iniţială a antigenului. În consecinţă, distanţa între precipitat şi locul de pornire al antigenului va fi proporţională cu concentraţia iniţială.

Imunodifuzia radială simplă *(Figura 11.35)* – metodă elaborată de **Mancini** în 1965 se bazează pe principiul introducerii unui volum măsurat de Ag într-un godeu tăiat în gel de agar tamponat, care conţine Ac. Ag difuzează radial până se atinge raportul optim Ag/Ac, când se formează un inel de precipitare. Între concentraţia proteinei şi pătratul diametrului zonei de precipitare există o relaţie lineară. Limita de sensibilitate este dependentă de abilitatea detectării şi a măsurării inelelor foarte mici.

Unul din impedimentele acestei metode este durata analizei. Metoda este de asemenea subiectivă (citirea diametrelor se efectuează cu ochiul liber) şi este dependentă de viteza de difuzie. În cazul componenţilor monoclonali polimerizaţi sau complexaţi, proteina anormală poate avea o viteză de difuzie considerabil diferită de cea a Ig normale de aceeaşi clasă, din aceeaşi probă. Rezultatul obţinut constă în formarea de inele de difuzie multiple, care fac analiza cantitativă dificilă, dacă nu imposibilă. In acest fel pot rezulta

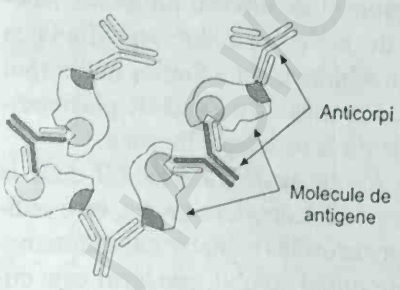


Figura 11.33. Imunoprecipitarea la zona de echivalenţă

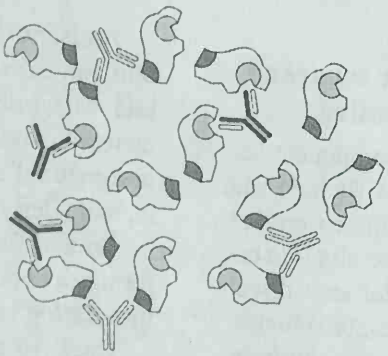


Figura 11.34a. Formarea de complexe solubile în prezenţa unui exces de antigen

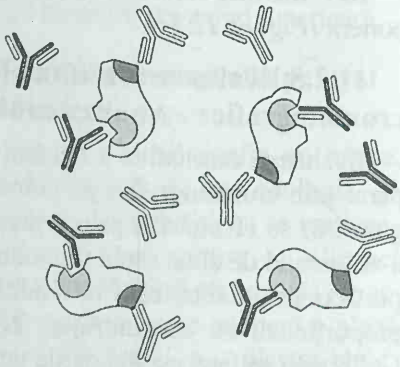


Figura 11.34b. Formarea de complexe solubile în prezenţa unui exces de anticorp

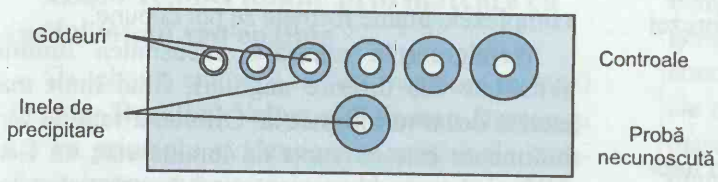


Figura 11.35. Imunodifuzia radială Mancini

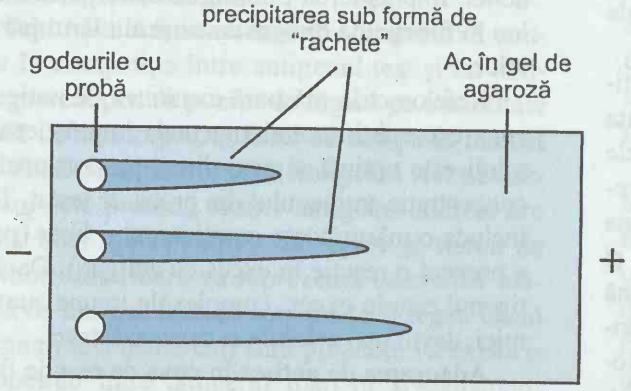


Figura 11.36. Electroforeză Laurell

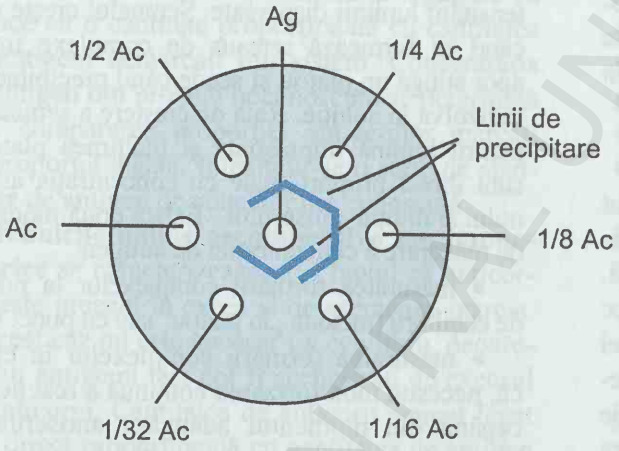


Figura 11.37. Dublă difuzie Ouchterlony

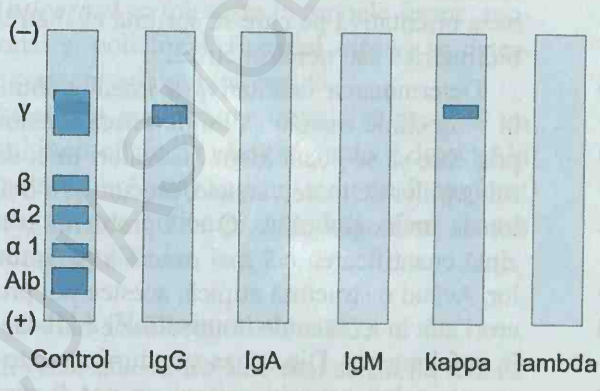


Figura 11.38. Imunofixare

subestimări (component monoclonal cu masă moleculară mai mare) sau supraestimări (component monoclonal cu masă moleculară mai mică). Excesul de Ag cauzat de concentraţii extreme ale componentului monoclonal poate de asemenea afecta concentraţia Ac-lui în ariile adiacente ale plăcii, producând complexe complet solubile ce nu se vizualizează. Situaţia se extinde în ariile adiacente unde probele produc inele aberante, ceea ce duce la inacurateţea rezultatelor.

Metoda Laurell *(Figura 11.36)*, introdusă în 1966, încearcă să înlăture durata mare a analizei, folosind electroforeza pentru a produce gradientul de concentraţie, faţă de difuzie. Anticorpul este incorporat în gel, electroforeza are loc la pH 8,6, condiţie în care anticorpii nu migrează semnificativ, dar proteinele, da. Prin electroforeză, zona de echivalenţă se atinge mult mai rapid decât prin difuzie şi liniile de precipitare apar sub formă de "rachete". Pentru cuantificarea probelor necunoscute se construieşte o curbă de calibrare reprezentând înălţimea "rachetelor" în raport cu concentraţia de antigen.

Dubla difuzie Ouchterlony *(Figura 37)* implică faptul că şi antigenul şi anticorpul sunt plasaţi în godeuri şi difuzează unul către celălalt. Precipitarea apare tot la punctual de echivalenţă, dar în acest caz precipitatul este sub formă de linie sau arc.

Imunofixarea. Pe suprafaţa gelului pe care se găsesc fracţiunile proteice separate electroforetic se aplică antiserurile monospecifice corespunzătoare imuno-globulinelor şi lanţurilor uşoare κ şi λ. Anticorpii difuzează în gel şi, în final, se formează imunoprecipitatul. Antigenii şi anticorpii rămaşi necomplexaţi sunt spălaţi şi îndepărtaţi, iar gelul se colorează. În final se obţin benzi bine delimitate *(Figura 11.38)*.

Avantajele metodei:

- puterea de rezoluţie este crescută, difuzia fiind minimalizată ;
- mobilităţile fracţiunilor se compară cu cele obţinute pe modelul electroforetic prezent de asemenea pe gelul de imunofixare, detectarea şi interpretarea compuşilor fiind uşoară ;

- metoda este rapidă, iar sensibilitatea este de 10 ori mai mare decât a imunoelectroforezei care nu se mai foloseşte.

Dezavantajele metodei:

- necesită Ac monospecific de titru înalt ;
- excesul de Ag duce la apariţia de găuri în interiorul benzii, ceea ce face necesară repetarea analizei cu Ag diluat ;
- necesită fixarea individuală a parametrilor de procesare.

Immunoblotting este o metodă prin care anticorpii se pot utiliza pentru a determina prezenţa sau identitatea antigenelor solubile. Antigenele solubile sunt aplicate pe o membrană de nitroceluloză, pe care se aplică şi anticorpii. Membrana se spală pentru a îndepărta anticorpii nelegaţi şi prezenţa sau absenţa antigenului se determină prin diferite mijloace. În primă fază, se separă antigenele solubile prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, cu sau fără sodium dodecil sulfat, apoi acestea sunt transferate de pe gel pe o membrană de nitroceluloză. Ulterior, anticorpii se folosesc să probeze prezenţa antigenelor. Moleculele marcate se vizualizează prin tehnici folosite în imunohistochimie sau prin autoradiografie.

11.3.3 Imunoprecipitarea în soluţie

Metodele turbidimetrice şi nefelometrice sunt metode cantitative prin care se poate măsura interacţiunea luminii cu particulele din suspensii. Când o rază luminoasă trece printr-un amestec ce conţine particule în suspensie, intensitatea ei scade datorită fenomenelor de absorbţie şi reflexie pe suprafaţa particulelor. Cele două metode utilizează sisteme optice de detectare ce măsoară concentraţiile particulelor foarte mici suspendate într-un lichid. Reacţia imunochimică are loc în cuva de reacţie şi este identică în ambele cazuri, diferă doar principiul de detectare.

Turbidimetria măsoară intensitatea luminii transmise înainte (intensitatea fasciculului luminos care nu îşi schimbă drumul optic). Formarea complexului Ag-Ac în urma reacţiei Ag cu Ac determină apariţia unui sistem dispers (turbidiscent). Deoarece în condiţii normale – adică în soluţii diluate – lumina transmisă reprezintă o parte substanţială a luminii incidente, o amplificare de mică intensitate este suficientă. Turbidimetrele se aseamănă cu spectrofotometrele şi folosesc lungimi de undă în domeniu 320 – 380 nm sau 500 – 650 nm. Timpul între prepararea probelor şi efectuarea măsurătorilor poate fi o sursă de eroare, deoarece complexele imune formate se pot depune.

Nefelometria măsoară intensitatea luminii refractate sub diferite unghiuri, fiind mult mai exactă decat turbidimetria. Diferenţa faţă de turbidimetrie este că sursa de lumină este un LASER şi detectorul care măsoară împrăştierea luminii este la un unghi drept faţă de lumina incidentă. Împrăştierea luminii de către particule are loc în funcţie de dimensiunea şi numărul particulelor.

Nefelometria măsoară cantitatea de antigen în zona excesului de anticorp unde împrăştierea luminii este optimă şi este direct proporţională cu concentraţia antigenului din proba de testat. Testul include o măsurătoare a anticorpului liber (pentru a preveni o reacţie în exces de antigen). Dacă antigenul este în exces, complexele imune sunt mai mici, devin mai solubile şi cauzează erori.

Adăugarea de antiser în cuva de reacţie declanşează reacţia antigen-anticorp. Formarea complexelor imune este semnalată prin creşterea intensităţii luminii dispersate. Semnalul creşte rapid când se formează reţeaua de complexe imune, apoi atinge un platou şi scade când precipitatul se redizolvă în soluţie. Rata de creştere a semnalului pentru lumina împrăştiată şi înălţimea platoului sunt direct proporţionale cu concentraţia antigenului şi diluţia antiserului. Există două modalităţi de măsurare a concentraţiei de antigen:

- măsurarea formării complexelor la punctul de echilibru (metoda „în platou" sau cu punct final)
- măsurarea formării complexelor în cinetică, necesită monitorizarea continuă a reacţiei, începând din momentul adăugării antiserului şi continuând cu verificare excesului de antigen.

Efectuarea în prealabil a electroforezei serului este o determinare care trebuie să constituie baza orientativă pe care se sprijină evaluarea turbidimetrică sau nefelometrică.

Determinarea cantitativă a imunoglobulinelor în scop clinic trebuie să asigure acea sensibilitate prin care să se poată identifica valori mici din serul copiilor de toate vârstele, precum şi a deficitelor de imunoglobuline. O altă problemă o reprezintă cuantificarea cât mai exactă a paraproteinelor. Având o structură atipică, acestea pot produce erori atât în tehnica de imunodifuzie radială, cât şi în nefelometrie. Din cauza structurii alterate a paraproteinelor, anumiţi epitopi nu pot fi recunoscuţi de către antiserurile poli - sau monoclonale, cea ce va duce la erori în determinare.

11.3.4 Tehnici imune prin marcare cu radioizotopi sau enzime

Ca tehnică analitică, a fost introdusă în 1960 de către **Rosalind Yalow** şi **Solomon Berson** şi are ca principiu evidenţierea cantităţii de complexe imune apărute prin producerea unui semnal chimic sau fizic măsurabil, ca răspuns la interacţiunea specifică Ag-Ac.

Tehnicile imune cu legare competitivă constau în competiţia între antigenul test şi un antigen marcat pentru poziţii de legare pe o cantitate fixată de anticorp. Dat fiind că antigenul marcat este fixat de anticorp, când antigenul test nemarcat nu este prezent, atunci antigenul marcat are acces liber spre poziţiile de legare şi starea de echilibru ulterioară va reprezenta cantitatea maximă de antigen marcat care poate fi legat. Când antigenii test nemarcaţi sunt prezenţi, va exista o competiţie între antigenii marcaţi şi nemarcaţi pentru utilizarea poziţiilor de legătură şi la echilibru, cantitatea de antigeni marcaţi legaţi se va reduce cu o cantitate proporţională cu cantitatea de antigeni nemarcaţi din sistem. Concentraţia de antigen din probele necunoscute se determină prin compararea proporţiei antigenilor marcaţi cu proporţia legată, folosindu-se o serie de standarde de antigen de concentraţie cunoscută.

Tehnicile imune necompetitive sau imunometrice se caracterizează prin faptul că anticorpul este prezent în exces şi de asemenea marcat. În acest caz nu este necesar un echilibru, deoarece toţi antigenii test pot fi sechestraţi de excesul de anticorpi. Cantitatea de anticorp marcat legat este direct proporţională cu cantitatea de antigen prezentă în proba de analizat.

Componenţii sistemelor imune

Anticorpul se foloseşte în ambele forme, monoclonal şi policlonal. Esenţial este să se determine concentraţia optimă cerută.

Substanţa marcatoare trebuie să producă un semnal înalt eficient (adică să poată fi detectat la concentraţie scăzută) în timp ce este încorporat în antigen sau anticorp, neavând efect asupra imunoreactivităţii lor.

11.3.4.1 RIA (Radioimmunoassay)

RIA este una dintre cele mai sensibile tehnici de detecţie a antigenelor sau anticorpilor.

Principiul RIA implică legarea competitivă a unui antigen marcat radioactiv şi a unui antigen nemarcat, la un anticorp de mare afinitate. Antigenul marcat este amestecat cu anticorpul la o concentraţie care saturează situsurile de legare ale anticorpului. Apoi este adăugat antigenul nemarcat, de concentraţie necunoscută. Cele două tipuri de antigen intră în competiţie pentru situsurile de legare ale anticorpului, deoarece anticorpul nu face distincţie între antigenul marcat şi cel nemarcat. Este măsurată scăderea cantităţii de antigen marcat legat de anticorp, în prezenţa antigenului nemarcat din probă, pentru a determina cantitatea de antigen prezent în probă.

Pentru marcarea antigenului sunt utilizaţi izotopi radioactivi, de ex. ^{125}I sau tritiu (^{3}H). Raportul între cantitatea de anticorp şi antigen marcat utilizaţi în reacţie este ales astfel încât numărul de epitopi de pe antigenul marcat depăşeşte numărul de situsuri de legare de pe anticorp. Prin urmare, antigenul nemarcat adăugat ulterior intră în competiţie cu antigenul marcat, pentru legarea de numărul limitat de anticorpi disponibili. O cantitate mică de antigen nemarcat prezent în probă va determina o scădere a cantităţii de antigen marcat care rămâne legat de anticorpi, iar această scădere va fi proporţională cu cantitatea de antigen nemarcat adăugată.

Pentru determinarea cu acurateţe a antigenului nemarcat din probă, este necesară realizarea în prealabil a unei curbe standard prin utilizarea unor probe care conţin antigen nemarcat în concentraţii cunoscute.

Pentru a putea determina cantitatea de antigen marcat rămas legat de anticorp, complexul Ag-Ac trebuie separat de Ag liber şi apoi se măsoară radioactivitatea complexului antigen-anticorp. Pentru separare se folosesc diverse mijloace, de ex. anticorpi secundari, proteina A stafilococică (are afinitate pentru IgG) sau utilizarea unei variante RIA în fază solidă, în care anticorpul este legat de particule de sepharoză sau de pereţii unei plăcuţe de polistiren.

Adaptarea acestei tehnici la formatul în microplăci şi disponibilitatea pe scară largă a sistemelor de cuantificare a radiaţiei, au permis utilizarea tehnicii RIA pentru detecţia şi cuantificarea unui mare număr de tipuri de antigene. De exemplu, datorită simplităţii tehnicii, RIA a fost utilizată cu mare amploare pentru detecţia antigenului HBs în screening-ul infecţiei cu virusul hepatitic de tip B la donatorii de sânge.

11.3.4.2 Testele imunoenzimatice (ELISA)

Testele imune implică utilizarea anticorpilor ca parte componentă a reacției. Testele imunoenzimatice utilizează enzime ataşate la unul din reactanții din testul imun pentru a permite cuantificarea printr-o reacție de culoare după adăugarea unui substrat sau cromogen corespunzător. Testele ELISA implică adăugarea reactivilor în etape succesive la moleculele legate de o fază solidă, incubări şi separarea reactivior legați de cei liberi prin etape de spălare.

În general, sistemele de teste ELISA existente pot fi împărțite în 3 tipuri: ELISA directă, indirectă şi în sandwich.

Toate cele 3 sisteme pot fi utilizate pentru elaborarea de teste ELISA competitive sau de inhibiție.

1. Etape **ELISA directă:**

Antigenul este ataşat fazei solide prin adsorbție pasivă, într-o primă etapă de incubare. Apoi, antigenul nelegat este îndepărtat prin spălare.

Într-o etapă următoare, la faza solidă acoperită de antigen, se adaugă anticorpi specifici pentru antigenele cuplate cu enzimă (conjugatul). Conjugatul se leagă de antigenul de pe suprafața fazei solide. După incubare, conjugatul nelegat este spălat şi o solutie de substrat cromogen pentru enzimă este adăugat în mediul de reacție. Enzima din componența conjugatului catalizează o reacție prin care se eliberează un compus colorat. Reacția de culoare este oprită după un anumit interval de timp şi intensitatea culorii este cuantificată prin spectrofotometrie.

2. **ELISA indirectă**

Sistemul indirect este similar celui direct prin faptul ca antigenul este direct legat la faza solidă, iar în etapa a doua se folosesc anticorpi de detecție (anticorpi primari) specifici pentru antigen.

Totuşi, acești anticorpi, spre deosebire de metoda directă, nu sunt cuplați cu enzima şi vor fi la rândul lor detectați de un al doilea set de anticorpi legați de o enzimă (anticorpi secundari). Anticorpii secundari recunosc imunoglobulinele produse de specia animalului utilizat pentru obținerea anticorpului primar şi se numesc *conjugați anti-specie*. Astfel, dacă anticorpul de detecție (anticorpi primari) este produs de şoarece, anticorpii cuplați cu enzima (anticorpi secundari) vor fi anticorpi antiimunoglobulină de şoarece, produşi de o altă specie, de ex., de iepure.

Conjugatul antispecie poate fi de tip anti Ig M, Ig G1, Ig G2 etc.

Sistemul (tehnica) indirectă oferă avantajul că un număr mare de antiseruri poate fi detectat utilizând un singur conjugat antispecie. Acest sistem a fost utilizat pe scară largă în diagnostic, mai ales în screening-ul unui număr mare de probe. Acest sistem are însă dezavantajul că serurile individuale prezintă capacități variabile de legare nespecifică, ceea ce lărgeşte dispersia (variabilitatea) rezultatelor testului.

3. **ELISA sandwich**

Acest sistem poate fi împărțit în două tipuri: ELISA sandwich directă şi indirectă.

ELISA sandwich directă implică ataşarea pasivă a anticorpilor la faza solidă. Aceşti anticorpi (anticorpi de captură) vor lega antigenul prezent în probă. După incubare şi spălare, va rămâne ataşat de faza solidă un complex antigen – anticorp. Antigenul cuplat va fi apoi detectat prin adăugarea unor anticorpi specifici cuplați cu enzima. Astfel, un conjugat direct este folosit pentru detecția antigenului. Acest al doilea anticorp poate fi acelaşi cu cel utilizat pentru captură sau poate fi diferit. După incubare şi spălare, se adaugă un substrat cromogen care va fi transformat de către enzimă într-un compus colorat dozabil prin spectrofotometrie.

Deoarece este utilizat un singur anticorp cuplat cu enzima, sistemul este limitat la specificitatea şi proprietățile acelui set de anticorpi. Sistemul este de asemenea limitat prin faptul că antigenul de detectat trebuie să aibă cel puțin doi epitopi, deoarece la aceştia trebuie sa se lege atât anticorpii de captură, cât şi cei de detecție. Aceasta poate limita utilizarea testului la complexe antigenice relativ mari.

Primele etape ale *ELISA sandwich indirecte* sunt similare cu cele ale tehnicii directe: anticorpii de captură sunt ataşați fazei solide, iar la aceştia se adaugă proba care conține antigenul de detectat. În etapa următoare, antigenul este detectat cu un anticorp de detecție care nu este, în acest caz, cuplat cu o enzimă. În tehnica indirectă, anticorpii de detecție sunt detectați, la rândul lor cu ajutorul unui conjugat antispecie. În final, în prezența substratului cromogen, enzima din componența conjugatului antispecie va dezvolta o reacție de culoare, a cărei intensitate va fi măsurată prin spectrofotometrie.

Bibliografie

1. *** Affinity chromatography, Principles and methods, Amersham Biosciences, 18-1022-29.
2. *** „Gel filtration, Principles and methods", Amersham Biosciences, 18-1022-18.
3. Ardo Y., Kristiansen K.R., „Chromatographic methods", Elsevier Science Ltd., 2002.
4. R. Bozer, „Modern Experimental Biochemistry", 3rd Ed, Benjamin / Cummings, Addison Wesley Longman, 2000.
5. Day E.D., „Advanced Immunochemistry", 2nd ed., Wiley-Liss, 1990.
6. De Michael Bishop L., Edward P. Fody, Larry E. Schoeff, „Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations", Lippincott Williams & Wilkins, 2004
7. C. Dennison, „A guide of protein isolation", Kluver Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002
8. D.J.Holme, H. Peck, Analitical Biochemistry, 3rd Ed, Pretince Hall, Pearson Education Limited, Addison Wesley Longman Limited, 1998.
9. M. Holtzhauer, „Basic methods for the Biochemical Laboratory", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006.
10. D. Le Carrer, „Serum protein electrophoresis immunofixation", Laboratoires Sebia, Hatier, 1994.
11. G. Mayer, Immunology – Cap. 4, „Immunoglobulins – structure and functions", University of South Carolina, 2005, http://www.med.sc.edu:85/mayer/IgStruct2000.htm.
12. J.A. O'Mahony, Y. Ardo, P.L. McSweeney, „Electrophoresis", Analysis, 2002, 67-74.
13. R.F. Ritchie, O. Navolotskaia, „Serum proteins in clinical medicine", Ist ed., vol.I Laboratory Section, 1996.
14. D.R. Westermeier, S. Gronau, „Electrophoresis in practice", 4th Ed, Wilez-VCH Verlag Gmb H & Co, KgaA, Weinheim, 2005.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 12.
Concepte de bază în interpretarea variațiilor patologice ale enzimelor serice

Mircea Cucuianu, Ioana Brudaşcă

După enzimologi, viața ar fi o funcție armonioasă a enzimelor, iar bolile s-ar putea defini ca fiind deficite sau dezordini ale sistemului enzimatic. O astfel de definiție, voit exagerată, este desigur menită să atragă atenția asupra importanței sistemelor enzimatice, a căror perturbare se situează între verigile patogenice cele mai importante.

Pentru practica clinică este în primul rând important de a stabili mecanismele care duc la modificări ale enzimelor detectabile prin metodele laboratorului clinic, respectiv de a se preciza valoarea diagnostică şi limitele determinărilor de enzime.

Pe de altă parte, hormonii, citokinele şi o mare parte a medicamentelor acționează prin intermediul sistemelor enzimatice, stimulând sau inhibând aceste sisteme prin diverse mecanisme. Din acest motiv este necesară o scurtă trecere în revistă a unor probleme cu caracter mai general privind noțiunea de enzimă, localizarea intracelulară a enzimelor, clasificarea şi mecanismul de acțiune al enzimelor, factorii de care depinde viteza unei reacții enzimatice, precum şi mecanismele de activare, de degradare şi de eliminare din organism a diverselor enzime.

12.1. Date generale privind enzimele

Enzimele sunt proteine produse de celulele vii şi dotate cu funcții catalitice specifice. Ele catalizează reacții enzimatice care, în lipsa lor, ar putea decurge doar foarte lent sau la temperaturi ridicate incompatibile cu viața. În calitatea lor de catalizatori, enzimele sunt dotate cu următoarele proprietăți: sunt eficiente în cantități mult mai reduse decât substanțele pe care le transformă şi care poartă denumirea de substrate; rămân practic neschimbate la sfârşitul reacției catalizate; nu modifică echilibrul unei reacții reversibile dar accelerează viteza cu care acest echilibru este atins.

Totodată, în calitatea lor de proteine, enzimele prezintă toate caracteristicile legate de structurile compuşilor proteici, putând fi denaturate de agenți care le alterează conformația şi putând fi separate şi purificate cu ajutorul tehnicilor utilizate în studiul proteinelor.

O proprietate importantă a reacțiilor enzimatice care au loc în celulele vii (*in vivo*) constă în posibilitatea de a fi susceptibile față de o reglare biologică, putându-şi creşte sau limita activitatea în funcție de anumite semnale şi oarecum în funcție de necesități.

Întrucât marea majoritate a reacțiilor biochimice sunt catalizate de enzime specifice, numărul de enzime descoperite şi descrise este în continuă creştere depăşind, la ora actuală, cifra de 2000.

12.1.1. Clasificarea şi nomenclatura enzimelor

Conform recomandării Comisiei pentru enzime (Enzyme Commission) a Uniunii Internaționale de biochimie, denumirea enzimelor se bazează pe următoarele criterii:

A. enzimele se împart în 6 clase principale în funcție de tipul reacției catalizate (*Tabelul 12.I*).

B. Numele fiecărei enzime are două părți. Prima parte indică substratul sau substratele asupra cărora acționează enzima; a doua parte a de-

numirii indică tipul de reacție catalizată, iar la sfârșit se adaugă sufixul ază.

C. Informații suplimentare privind eventualele particularități ale reacției catalizate pot fi date în paranteză.

D. Fiecare enzimă are un număr de cod: prima cifră indică tipul de reacție (clasa de enzime); eventuala subclasificare este semnalată de următoarele două cifre iar a patra cifră indică enzima individuală din respectiva clasă. Numărul de cod este precedat de inițialele EC (Enzyme Commission).

Așa de exemplu creatinkinaza (CK, notată și CPK), care catalizează reacția:

ATP + creatinină $\xrightarrow{CK}$ ADP + creatinfosfat;

ar avea ca denumire științifică: ATP - creatinfosfotransferază iar numărul de cod ar fi EC 2.7.3.2 (2 pentru clasa transferazelor, 7 pentru subclasa fosfotransferazelor, 3 pentru grupul de fosfotransferaze având ca acceptor un radical nitrogen, iar 2 pentru locul enzimei în cadrul subgrupei).

Conform aceluiași principiu, o serie de enzime determinate în mod curent în laboratorul clinic ar căpăta denumiri recomandate de EC. De exemplu:

- transaminaza glutamic oxalacetică (GOT) ar deveni EC 2.6.1.1. L-aspartat-2-oxoglutarat aminotransferază (ASAT sau AST);
- transaminaza glutamic piruvică (GPT) s-ar denumi corect EC 2.6.1.2. L-alanin-2 oxoglutarat aminotransferază (ALAT sau ALT);
- lactatdehidrogenaza (LDH) s-ar denumi EC 1.1.1.27. L-lactat NAD oxidoreductază;
- colinesterază serică (CHE) s-ar defini ca EC 3.1.1.8 acil colinacilhidrolază.

Astfel de denumiri și numere de cod facilitează găsirea enzimelor în cataloage și evită confuziile, dar îngreunează comunicarea rapidă între secțiile clinice (incluzând și personalul mediu) și laborator. Din acest motiv, denumirile uzuale ale enzimelor (și de cele mai multe ori doar prescurtările acestor denumiri) înrădăcinate în patologia clinică se vor folosi pe parcursul acestui capitol.

12.1.2. Structura și mecanismul de acțiune ale enzimelor

Perfecționarea tehnicilor de separare și purificare a enzimelor, alături de studii de difracție a razelor X de către un cristal de protein-enzimă, precum și stabilirea de corelații între activitatea unei enzime și eventualele modificări induse în

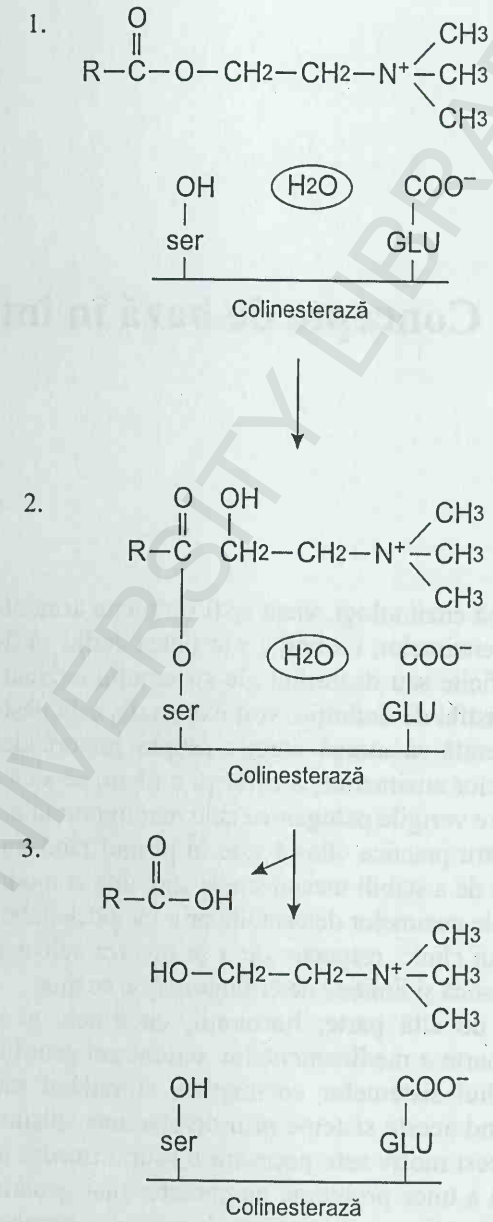


Figura 12.1. Exemplu ilustrativ privind structura centrului activ al unei enzime.

În cazul colinesterazei serice (CHE) principalii constituenți ai centrului activ sunt o grupare anionică -COO⁻) și un radical serină. Reacția catalizată de CHE ar decurge în următoarele etape: 1) alinierea substratului acilcolină la centrul activ al enzimei; 2) desfacerea legăturii ester a acilcolinei și formarea unei legături ester trecătoare între acidul gras și radicalul serină din centrul activ al CHE; 3) adiționarea unei molecule de H_2O și desfacerea legăturii tranzitorii dintre serină și acidul gras. Rezultatul final al acestei reacții de hidroliză este scindarea acilcolinei în acid gras și colină, care reprezintă produșii de reacție și care se desprind apoi de pe suprafața enzimei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

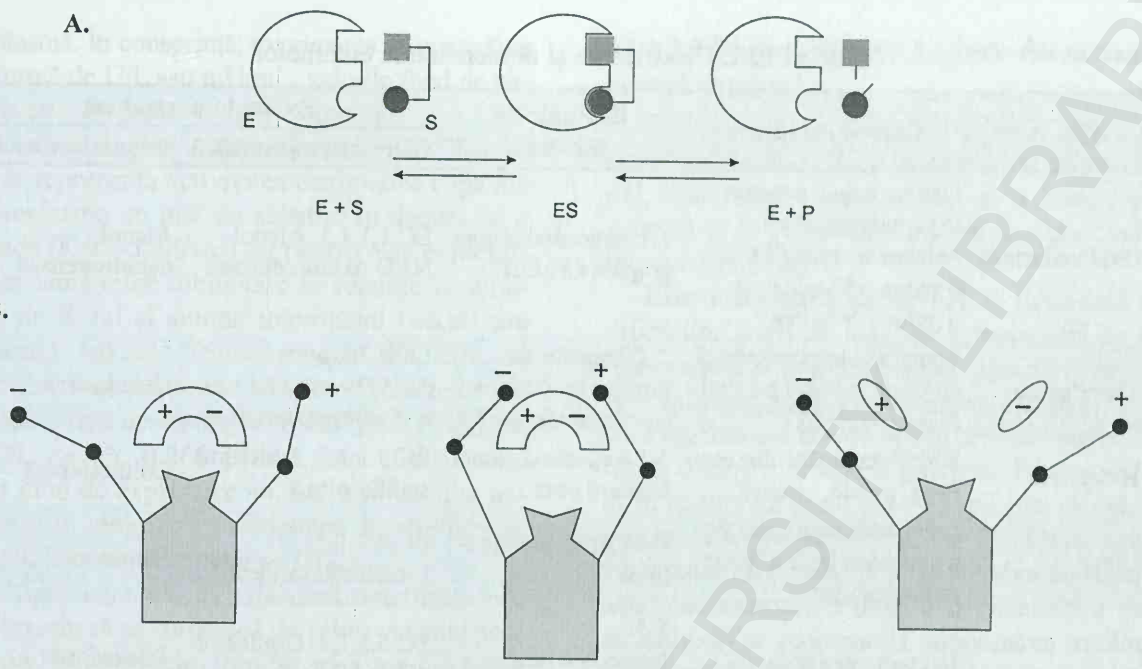


Figura 12.2. Reprezentarea schematică a formării complexelor enzimă substrat.
E = enzimă; S = substrat; P = produs de reacție; **A.** ipoteza tiparului rigid conform căruia substratul se potrivește în centrul activ al enzimei "precum cheia în broască"; **B.** ipoteza modificărilor conformaționale suferite de enzimă în cursul fixării substratului.

compoziția în aminoacizi a enzimei au permis o mai bună înțelegere a structurii enzimelor și totodată a mecanismului de acțiune.

Orice enzimă prezintă un **centru activ** în care diverșii radicali aminoacidici sunt aranjați spațial în așa fel încât să permită fixarea și modificarea substratului. Așa de exemplu centrul activ al colinesterazei conține acid glutamic (radical acid COO^-) de care se fixează gruparea bazică a colinei ($-N^+(CH_3)_3$) și un radical serină prevăzută cu un oxidril prin care stabilește o legătură ester tranzitorie cu acidul gras din molecula de acilcolină (vezi *Figura 12.1*).

Alte zone din structura protein-enzimei pot fixa micromolecule care, diferă față de substrat, dar care modifică afinitatea enzimei față de substrat (crescând-o sau diminuând-o). Astfel de zone **alosterice** pot interveni astfel în reglarea activității enzimelor. Asupra activatorilor și inhibitorilor alosterici se va reveni.

Natura acizilor aminați din structura unei enzime are importantă și pentru **formarea unor complexe** cu rol în procesul de activare al enzimei respective. Așa de exemplu protrombina și factorii coagulării VII, IX și X, alcătuind așa zisele proteaze serinice dependente de vitamina K, sunt dotați cu grupări gama-carboxiglutamice care nu intră în centrul activ al enzimelor menționate, dar prin intermediul cărora se stabilesc punți de calciu cu fosfolipidele și se formează complexe cu proteazele activatoare, ceea ce duce la activarea protrombinei și a celorlalți zimogeni, prin proteoliză limitată.

Modificările conformaționale induse, de exemplu, prin căldură sau prin agenți oxidanți, alterează structura proteinenzimei și duc la pierderea activității enzimatice.

Așa cum se pot vedea din *Figurile 12.1 și 12.2,* reacția enzimatică poate fi concepută ca petrecându-se în două etape: formarea complexului enzimă-substrat, urmată de modificarea substratului și desprinderea de pe enzimă a produșilor rezultați.

Zona activă a unei enzime nu mai este astăzi concepută ca un tipar strict preformat și rigid, în care substratul se potrivește precum cheia în broască. Există de fapt dovezi pentru teoria lui Koshland conform căreia zona activă a enzimei este dotată cu o oarecare plasticitate, astfel încât substratul poate induce modificări conformaționale ale enzimei care devine mai receptivă față de substrat și ajunge "să se potrivească" mai bine cu acesta.

12.1.2.1. Specificitatea unei reacții enzimatice

Spre deosebire de catalizatorii neproteici care pot cataliza o mare varietate de reacții chimice, enzimele prezintă **o specificitate de reacție și o**

Tabelul 12.I. Clasificarea și nomenclatura enzimelor

Clasa	Reacții catalizate	Exemple de subclase	Exemplu ilustrat cu:	
			Denumirea științifică	Denumirea uzuală
1. Oxidoreductaze	Oxidarea unui substrat (S) concomitent cu reducerea altuia (S'); S redus + S' oxidat → S'redus + S oxidat	1-1 Acționând asupra grupării CH-OH	EC 1.1.1.1. Alcool-NAD oxidoreductază	Alcool dehidrogenază
2. Transferaze	Transferul unei grupări G de pe un substrat pe altul SG+S' → S+S'G	2-7 Transfer de grupări fosfat (fosfotransferaze)	EC 2.7.1.1. ATP-D-hexozo-6 -fosfotransferază	Hexokinază
3. Hidrolaze	Hidroliza legăturilor eter, ester, peptid, glicozil;	3-1 Acționând asupra legăturii ester	EC 3.1.1.8. Acilcolină acilhidrolază	Colinesterază
4. Liaze	Îndepărtează grupări de pe substrat lăsând în loc duble legături	4-2 Carbon-oxigen-liază	EC 4.2.1.2. L-malat-hidroliază	Fumarază
5. Izomeraze	Interconversiunea izomerilor	5-3 Interconversiunea aldozelor și cetozelor	EC 5.3.1.1. D-gliceral-dehid-3-fosfat-ketol-izomerază	Triozofosfat izomerază
6. Ligaze	Formarea legăturilor C-O, C-N, C-S în reacții cuplate cu degradare de ATP	6-3 Formarea legăturii C-N	EC 6.3.1.2. L-glutamat-amoniu-ligază	Glutaminsintetază

specificitate de substrat. Prin specificitatea de reacție se înțelege capacitatea enzimelor de a cataboliza doar un anumit tip de reacție (oxido-reducere, transfer, hidroliză etc.). Specificitatea de substrat este mai relativă, în sensul că majoritatea enzimelor pot cataliza o anumită reacție, acționând asupra unor substrate înrudite structural. Așa de exemplu colinesteraza serică hidrolizează o serie de esteri ai colinei (acetilcolină, benzoilcolină, butirilcolină, acest din urmă ester fiind hidrolizat mai rapid și reprezentând un așa-zis substrat preferențial).

De asemenea, plasmina scindează proteolitic nu numai fibrina ci și alte proteine, ca de exemplu cazeina, hemoglobina, factorii V și VIII ai coagulării precum și unii esteri sintetici ai argininei și lizinei. Având însă o afinitate deosebită față de fibrină, aceasta va constitui substratul preferențial.

Dacă specificitatea de substrat este oarecum relativă, **specificitatea de grup** este însă strictă, înțelegându-se prin aceasta că o anumită enzimă acționează numai asupra unor grupări chimice particulare. Astfel chimotripsina hidrolizează doar legăturile peptidice în care gruparea carboxil este dată de un acid aminat aromatic (fenilalanină, tirozină), iar trombina acționează numai asupra legăturilor peptidice dintre arginină și glicocol.

Există și o **specificitate optică**, anumite enzime acționând doar asupra izomerilor D (de exemplu enzimele glicolitice) sau doar asupra izomerilor L (enzimele cu rol în metabolismul acizilor aminați). Se admite și o **specificitate de coenzimă.** Așa de exemplu oxidoreductazele acționând în procesele de biosinteză utilizează $NADPH_2$ ca reducător, în timp ce enzimele oxidoreductoare cu rol în procesele de degradare utilizează de preferință NAD ca acceptor de hidrogen.

12.1.2.2. Principii de determinare a unei activități enzimatice

Dozarea enzimelor se bazează pe determinarea activității lor, adică pe capacitatea de a cataliza o anumită reacție. De fapt, în condiții optimizate, viteza unei astfel de reacții este proporțională cu cantitatea de enzimă prezentă în mediu. Ca urmare, exprimarea activității unei enzime se face pe baza vitezei reacției catalizate (respectiv cantitatea de substrat modificat pe unitatea de timp).

Conform definiției date de Uniunea Internațională de Biochimie, o unitate enzimatică (U) catalizează transformarea unui micromol de substrat în decurs de un minut în condițiile standard recomandate. În laboratoarele clinice se obișnuiește ca activitatea enzimatică să se raporteze la 1 litru sau la 1 mL ser

sau plasmă. În consecință, exprimarea se poate face sub formă de U/L sau mU/mL, valorile fiind de altfel identice din punct de vedere numeric.

Se discută şi adoptarea noțiunii de "Katal" care ar reprezenta activitatea enzimatică capabilă să transforme un mol de substrat în decurs de o secundă (Kat = mol/sec) iar pentru a se evita utilizarea numerelor subunitare se recurge la subunități de Katal şi anume microkatal (μKat) sau nanokatal (nKat). Transformarea din U/L în μKat/L se face împărțind U/L la 60 (1 minut = 60 secunde). Aşa de exemplu o activitate ASAT de 16 U/L devine 0,266 μKat/L sau 266 nKat/L. Acest mod de exprimare nu este însă unanim acceptat şi în majoritatea revistelor de specialitate rezultatele sunt prezentate ca U/L.

În lipsa unor reactivi standard optimizați este însă iluzoriu să se vorbească de valori valabile pentru toate laboratoarele, întrucât mici modificări în tehnica de lucru produc mari variații ale valorilor activității enzimatice. Aşa de exemplu; valorile normale ale lactatdehidrogenazei (LDH) determinate la 25°C oscilează între 120-240 U/L, în timp ce la 37°C aceste valori se situează între 260-500 U/L. De asemenea, activitatea colinesterazei serice determinate ca substrat de acetilcolină se situează la normali între 160-260 μmoli/mL/oră (2666-4333 U/L) în timp ce prin utilizarea ca substrat a butiriltiocolinei valorile normale oscilează între 4500 şi 11000 U/L. În cazul transaminazelor (aminotrasferazelor) limita superioară a valorilor determinată la 37°C cu reactivi optimizați se studiază la 42 U/L pentru ASAT şi pentru ALAT, în timp ce cu reactivii preparați în majoritatea laboratoarelor din țară aceste valori normale nu trebuie să depăşească 16 U/L. Şi mai mari sunt diferențele între valorile normale ale fosfatazei alcaline, care cu metoda clasică Bessey-Lowry nu depăşesc 48 U/L, iar cu reactivi având tampon de trietanolamină se situează până la 300U/L la adult şi până la 600 U/L la copii.

Din motivele arătate mai sus este recomandabil ca, până la introducerea de reactivi optimizați în toate laboratoarele din țară, fiecare laborator clinic să-şi stabilească valorile normale în condițiile de lucru şi cu reactivii care îi sunt accesibili.

Din aceleaşi motive, pe parcursul acestui capitol ne vom feri de a exprima variațiile patologice sub formă de unități/litru ci doar ca multipli ai limitei superioare a normalului sau ca procente din media valorilor normale, iar în cazul când se prezintă U/L se va preciza metoda utilizată şi valorile normale ale metodei.

12.1.2.3.Factori de care depinde viteza unei reacții enzimatice

Principalii factori de care depinde viteza unei reacții enzimatice sunt temperatura, valoarea de pH, concentrația substratului şi a coenzimelor precum şi de eventuala intervenție a unor activatori sau inhibitori.

Efecte dependente de pH se datorează modificărilor stării de ionizare a moleculei de protein-enzimă şi implicit asupra capacității de fixare a substratului în centrul activ al enzimei. Fiecare enzimă are un pH optim la care reacția catalizată decurge cu viteză maximă. Pentru majoritatea enzimelor acest pH este apropiat de cel fiziologic, situându-se între 6,9 şi 7,7. Dacă însă reacția catalizată decurge cu eliberarea de compuşi acizi (de exemplu hidroliza trigliceridelor sau a acilcolinei) se recomandă tamponarea ionilor de hidrogen şi deci folosirea unui tampon alcalin între pH8 şi pH9. De menționat că activitatea fenoloxidazică a ceruloplasminei decurge în condiții optime la pH 5,5, iar cea a pepsinei la un pH mult mai acid, corespunzând sucului gastric în perioada de stimulare a secreției.

Efectul temperaturii se vădeşte prin accelerarea reacțiilor enzimatice odată cu creşterea temperaturii. Peste o anumită limită, denumită temperatură critică şi care variază de la enzimă la enzima, componenta proteică a sistemului enzimatic se denaturează şi activitatea enzimatică încetează.

Efectul concentrației substratului este ilustrat în *Figurile 12.3.* şi *12.4.* Se poate vedea că şansele de formare a complexelor enzimă-substrat sunt reduse dacă concentrațiile de substrat sunt joase şi că formarea complexelor amintite creşte progresiv odată cu creşterea concentrației substratului respectiv. Implicit are loc o accelerare a reacției enzimatice care decurge conform ecuației Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{Km + [S]}$$

în care: v = viteza de reacție; V_{max} = viteza maximă la care poate ajunge reacția; [S] = concentrația substratului; Km = constanta Michaelis (*Figura 12.4.*)

Pentru a transforma curba hiperbolică a relației dintre v şi [S] într-o dreaptă s-a convenit ca aceşti parametri să fie exprimați prin valorile lor

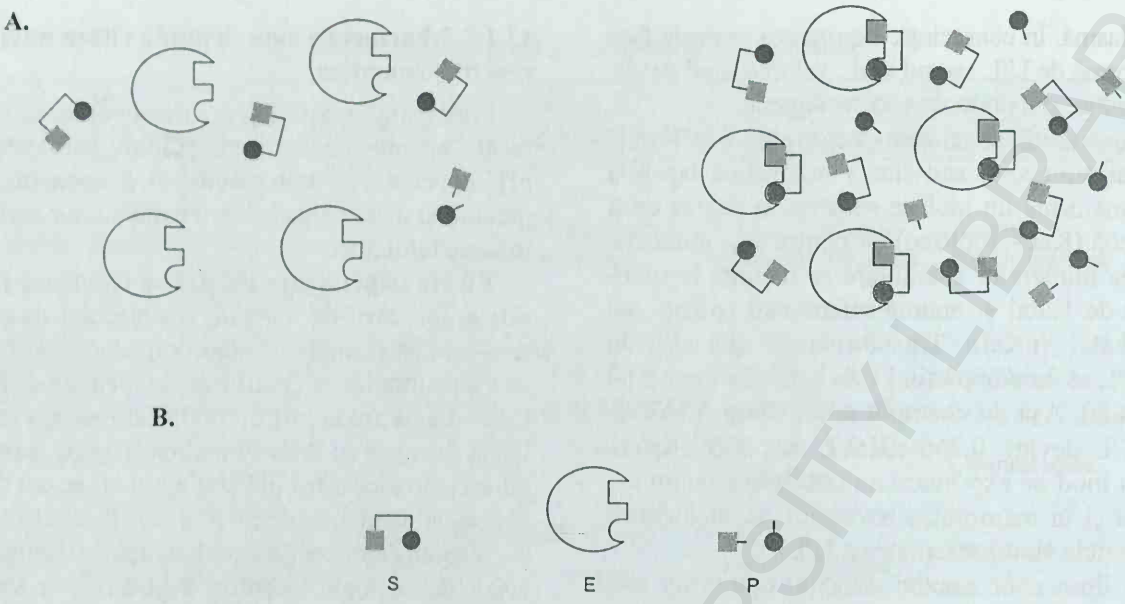


Figura 12.3. Reprezentare schematică a unor diferite raporturi între concentrația enzimei (E) și cea a substratului (S).

A. La concentrații joase de substrat doar o parte a moleculelor de enzimă fixează substrat iar reacția enzimatică decurge neeconomic. **B.** La concentrații ridicate de substrat toate moleculele de enzimă sunt combinate cu substratul, reacția decurgând cu viteză maximală și rezultând cantități sporite de produși de reacție (P).

reciproce, adică 1/v și 1/[S] ajungându-se astfel la ecuația:

$$\frac{1}{v}=\frac{Km+[S]}{V_{max}[S]} \quad sau \quad \frac{1}{v}=\frac{Km}{V_{max}}x\frac{1}{[S]}+\frac{[S]}{V[S]},$$

care prin simplificare devine:

$$\frac{1}{v}=\frac{Km}{V_{max}}x\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V}$$

Avându-se în vedere că doar v și [S] sunt variabile, în timp ce Km și V_{max} sunt constante pentru o anumită pereche enzimă-substrat, ecuația de mai sus este de tipul Y = ax + b care dă o reprezentare grafică lineară, așa-zisa reprezentare dublu reciprocă imaginată de Lineweaver și Burk (*Figura.12.5).*

Pe baza acestei relații și efectuându-se doar 4-5 determinări ale activității enzimatice, la concentrații diferite de substrat, se poate calcula constanta Michaelis (Km), adică acea concentrație de substrat la care viteza reacției enzimatice decurge cu jumătate din viteza maximă ($V_{max}/2$). Pentru prepararea reactivilor utilizați la determinarea activităților enzimatice se recomandă o concentrație de substrat de cel puțin zece ori mai ridicată decât Km. De notat că o valoare crescută a Km indică o afinitate redusă a enzimei față de substrat sau prezența unui inhibitor competitiv (*Figura 12.6*).

Rolul coenzimelor devine evident în cazul unor enzime care își exercită efectul lor catalitic doar în prezența unor anumite molecule organice neproteice (termostabile și dializabile). Aceste molecule denumite coenzime sunt necesare pentru activitatea oxido-reductazelor, transferazelor, izomerazelor și ligazelor (clasele 1, 2, 5, 6) în timp ce hidrolazele și liazele (clasele 3 și 4) nu necesită coenzime.

Coenzimele având, de cele mai multe ori, în compoziția lor vitamine din grupul B pot fi împărțite în două mari grupe:

1. Coenzime implicate în procesele de oxidoreducere (transfer de H^+), grupă în care se includ nicotin-adenin-dinucleotidul (NAD^+) și o formă fosforilată a acestuia ($NADP^+$) conținând în structura lor vitamina PP, flavin-mononucleotidul (FMN) și flavin-adenin-dinucleotidul (FAD), ambele conținând în structura lor riboflavină (vit.B_2). Tot în această grupă se includ acidul lipoic (acid 6-8 di-tio-octanoic) care prin grupările SH poate deveni donator sau acceptor de protoni, precum și coenzima Q, o chinonă care intervine în procesele de fosforilare oxidativă.

2. Coenzime implicate în transferul altor grupe decât H^+, această grupă incluzând coenzime cu rol în transferul de grupări fosfat (de ex. ATP), vitamina B1 cu rol în reacția de decarboxilare a acidului piruvic și vitamina B_6 (piridoxalfosfat) cu rol în reacțiile de transfer a grupări-

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

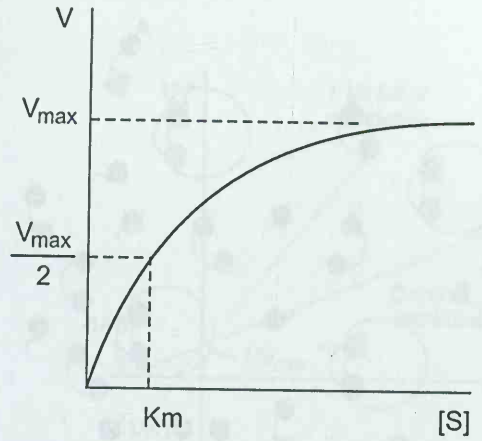
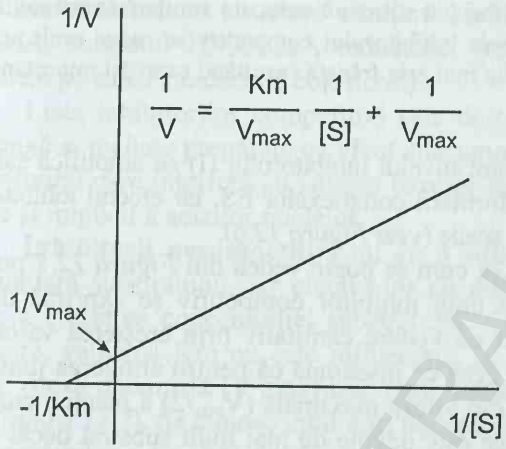


Figura 12.4. Relația dintre concentrația substratului (S) pe abscisă și viteza reacției enzimatice (V) pe ordonată.
Concentrația substratului la care viteza de reacție este egală cu $V_{max}/2$ corespunde constantei Michaelis-Menten (Km) pentru enzima respectivă.

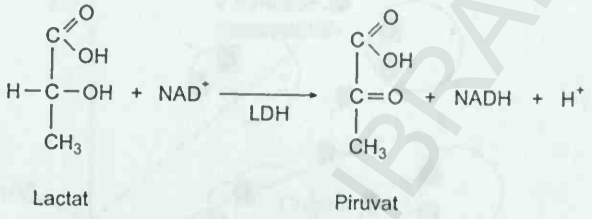


$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

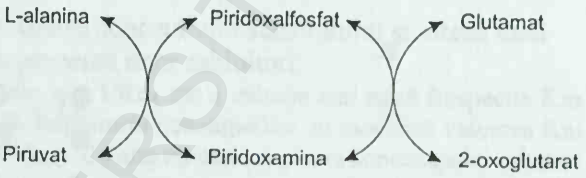
Figura 12.5. Reprezentarea Lineweaver-Burk a relației dintre 1/[S] și 1/V.
Intersecția dreptei cu ordonata indică $1/V_{max}$, iar intersecția cu abscisa reprezintă valoarea -1/Km.

lor amino (aminotransferaze). Tot în această grupă se includ coenzima A conținând în structura ei acidul pantotenic și intervenind în transferul de radicali acetil, precum și acidul folic și vitamina B_{12} cu rol în transferul de grupări cu un atom de carbon cum ar fi grupul formil (-CHO), formiat (HCOOH) sau hidroximetil ($-CH_2OH$).

Pentru înțelegerea mecanismului de acțiune al coenzimelor este important de reamintit că aceste substanțe pot fi considerate ca un al doilea substrat, respectiv co-substrat, suferind modificări concomitente cu substratul. Așa de exemplu, în reacțiile de oxidoreducere o moleculă de substrat se oxidează (se dehidrogenează), în timp ce o moleculă de coenzimă se reduce (se hidrogenează):



Pe de altă parte, în reacțiile de aminotransferare, piridoxalfosfatul (vitamina B_6) acționează ca un transportor intermediar de grupări amino între doi aminoacizi:



Rolul unor metale în desfășurarea reacțiilor enzimatice se evidențiază pe mai multe planuri. Așa de exemplu Fe, Cu și Mo participă în reacțiile de oxidoreducere, ionii de Mg^{2+} sunt necesari în reacțiile care asigură transferul grupării fosfat, ionii de Ca^{2+} sunt necesari în procesele de activare a factorilor coagulării și în anumite procese de fosforilare, iar o serie de peptidaze sunt activate de Mn^{2+} sau Ca^{2+}.

S-au sugerat diferite mecanisme prin care metalele ar putea influența reacțiile enzimatice.

a. Participarea directă a ionilor de metal în cataliza prin schimbări de valență în cursul reacției de oxidoreducere și a transportului de electroni (de ex. Fe în citocromi).

b. Formarea de complexe cu substratul (de ex. complexe ale ATP cu ionii de magneziu în reacția de fosfotransferare).

c. Formarea de complexe enzimă-metal-substrat (de ex., ionii de calciu) asigură formarea unui complex între fosfolipide, factorul Xa (enzima activatoare) și protrombina (zimogenul activabil), care în cazul de față joacă rol de substrat.

d. Inducerea unor modificări conformaționale care duc la activarea enzimei sau îi mențin o structură activă (de ex. ionii de Zn în alcooldehidrogenaza hepatică).

Se pare deci că efectele carenței de oligoelemente, asupra cărora se insistă în literatura de specialitate din ultimii ani, se exercită tocmai prin anomalii în modularea reacțiilor enzimatice.

Metalele pot exercita însă și efecte negative asupra enzimelor. Așa de exemplu, grupările SH

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

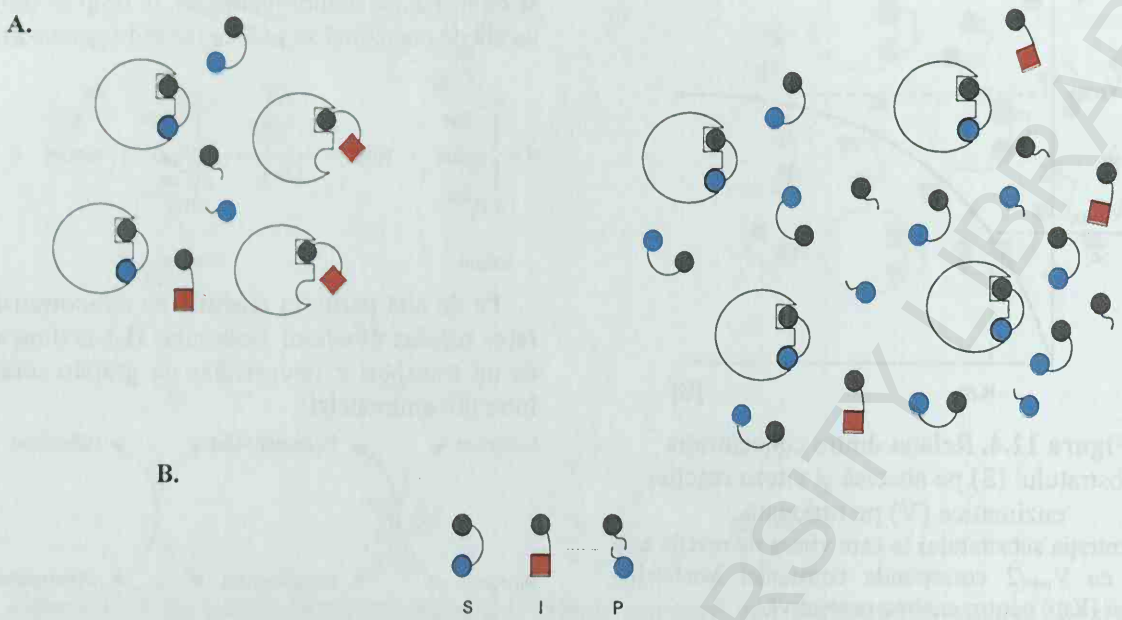


Figura 12.6. Competiția dintre substrat (S) și inhibitorul competitiv (I) pentru centrul activ al enzimei (E). **A.** În cazul unei concentrații reduse de substrat, șansele inhibitorului (cu structură oarecum similară substratului) de a ocupa centrul activ al enzimei sunt mult facilitate. **B.** Șansele inhibitorului competitiv se reduc mult prin creșterea concentrației substratului astfel încât reacția enzimatică nu mai este frânată rezultând cantități importante de produși de reacție (P).

din centrul activ al transglutaminazei (factorul XIII al coagulării) pot fi blocate de către metale grele, cum ar fi Hg, ducând la inactivarea consecutivă a enzimei.

Efectul inhibitorilor de enzime constituie o problemă de o deosebită importanță pentru reglarea funcțiilor organismului și pentru înțelegerea mecanismului de acțiune al unor medicamente.

Din punct de vedere al mecanismului de acțiune toți inhibitorii (fiziologici și nefiziologici) pot fi împărțiți în două mari grupe: inhibitori competitivi și inhibitori necompetitivi.

O altă modalitate de clasificare a inhibitorilor de enzime se bazează pe locul de acțiune, distingându-se inhibitori care acționează asupra centrului activ al enzimei și inhibitori alosterici, care afectează reacția enzimatică acționând într-o altă zonă a moleculei de enzimă.

Inhibitorii competitivi sunt substanțe cu structură chimică asemănătoare substratului (analogi chimici ai substratului) și concurează cu acesta pentru ocuparea centrului activ al enzimei zona catalitică). Ca urmare a competiției între substrat și inhibitorul competitiv se formează complexe enzimă-inhibitor competitiv (EI) în dauna formării de complexe enzimă-substrat (ES), ceea ce duce la scăderea activității enzimatice. Crescându-se însă mult concentrația substratului (S) și menținându-se constant nivelul inhibitorului (I) se amplifică șansele formării complexelor ES, iar efectul inhibitorului scade (vezi *Figura 12.6).*

Așa cum se poate vedea din *Figura 12.7* prezența unui inhibitor competitiv se exprimă din punct de vedere cantitativ prin creșterea valorii Km, ceea ce înseamnă că pentru atingerea jumătății din viteza maximală ($V_{max}/2$) a reacției enzimatice este nevoie de mai mult substrat decât în lipsa inhibitorului competitiv.

Există numeroase exemple de inhibitori competitivi. Astfel, sulfamidele sunt analogi chimici ai acidului p-aminobenzoic (*Figura 12.8*) și inhibă sistemele enzimatice ale microbilor care utilizează p-aminobenzoat pentru formarea de acid folic. De asemenea, anticoagulantele orale de tip cumarinic au o structură analoagă vitaminei K și astfel inhibă sistemele enzimatice dependente de vitamina K (carboxilaza) și implicit reduc formarea de grupări gama-carboxilglutamice din factorii II, VII, IX și X ai coagulării. De notat că în lipsa grupărilor gama-carboxilglutamice fixatoare de calciu, factorii coagulării mai sus amintiți nu sunt activabili.

Așa cum s-a arătat în *Capitolul 8*, scăderea sintezei de colesterol în urma tratamentului cu inhibitori ai HMG-CoA reductazei se explică prin aceea că astfel de inhibitori (Lovastatin,

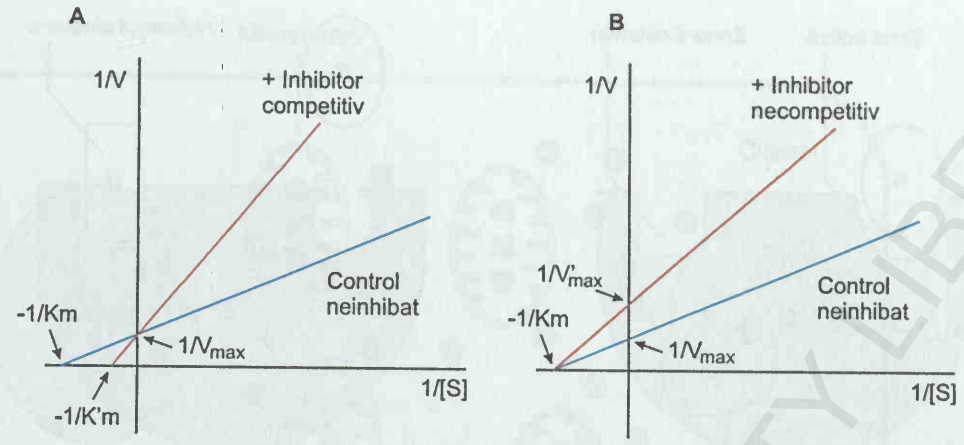


Figura 12.7. Reprezentarea dublu reciprocă a relației dintre concentrația substratului și viteza unei reacții enzimatice în absența și în prezența unor inhibitori.
A. Inhibitorul competitiv nu modifică viteza maximă de reacție, dar 1/Km are o valoare mai mică (respectiv Km are o valoare mai mare) în prezența unui astfel de inhibitor. **B.** Inhibitorul necompetitiv nu modifică valoarea Km dar reduce viteza maximală $1/V'_{max} > 1/V_{max}$ (respectiv $V'_{max} < V_{max}$). Cu alte cuvinte creșterea concentrației substratului nu diminuă efectele unui inhibitor necompetitiv.

Simvastatin) au o structură similară cu HMG-CoA, subtratul HMG-CoA reductazei (enzima cheie pe calea sintezei de colesterol).

Lista inhibitorilor competitivi este destul de lungă și include preparate cu efect antitumoral și antiviral care interferă cu sinteza bazelor purinice și implicit a acizilor nucleici.

Inhibitorii necompetitivi nu au o structură similară substratului, iar efectul lor nu diminuă prin creșterea concentrației substratului. Ca urmare, valoarea Km nu este influențată, în timp ce viteza maximală (V max) este mult diminuată (*Figura 12.7*). Se cunosc inhibitori necompetitivi reversibili care se pot desprinde de pe enzimă și inhibitori necompetitivi ireversibili care constituie adevărate "otrăvuri ale enzimelor". Între aceștia din urmă se numără iodoacetamida, săruri ale metalelor grele (Ag^{2+}, Hg^{2+}) și o serie de agenți oxidanți. De notat că aspirina este un inhibitor necompetitiv ireversibil al ciclooxigenazei din plăcuțele sanguine.

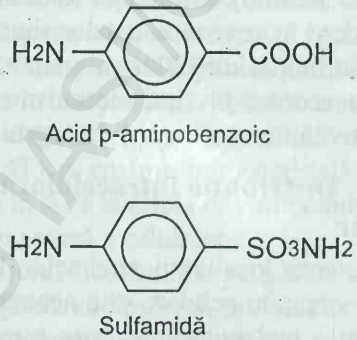


Figura 12.8. Analogia între structura chimică a acidului paraaminobenzoic și cea a unei sulfamide.

Inhibitorii alosterici afectează reacțiile enzimatice fixându-se într-o altă zonă a enzimei, diferită de centrul activ. Ca urmare a fixării inhibitorului în așa-zisa zonă alosterică (*alos* = alt; *stereos* = spațiu) se produc modificări conformaționale ale enzimei care îi reduc afinitatea față de substrat (*Figura 12.9*) și implicit încetinesc reacția enzimatică.

Întrucât diverși modificatori ai reacțiilor enzimatice acționând pe zona alosterică pot duce nu doar la inhibarea enzimei dar și la activarea acesteia, crescându-i afinitatea față de substrat, este mai corect să se utilizeze termenul de efectori alosterici. Așa de exemplu citratul, rezultat din ciclul acizilor tricarboxilici inhibă alosteric fosfofructokinaza, limitând procesul de glicoliză dar totodată activează prin același mecanism alosteric acetil-CoA carboxilaza stimulând biosinteza de acizi grași.

Importanța pentru medicină a inhibitorilor de enzime prezintă aspecte multiple. Pe lângă exemplele arătate mai sus cu implicații farmacologice, este de subliniat rolul inhibitorilor de proteaze (antitrombina, α_2-antiplasmina) care previn o activare intravasculară a coagulării sau o activitate fibrinolitică scăpate de sub control. Asupra inhibitorilor plasmatici ai proteazelor s-a insistat în *Capitolul 10*.

Inhibitori ai proteazelor se găsesc și în parazitul intestinal Ascaris care astfel rezistă la acțiunea proteolitica a sucurilor digestive. Fasolea, soia și albușul de ou crud conțin, de asemenea, inhibitori de proteaze, ceea ce le diminuă digestibilitatea.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

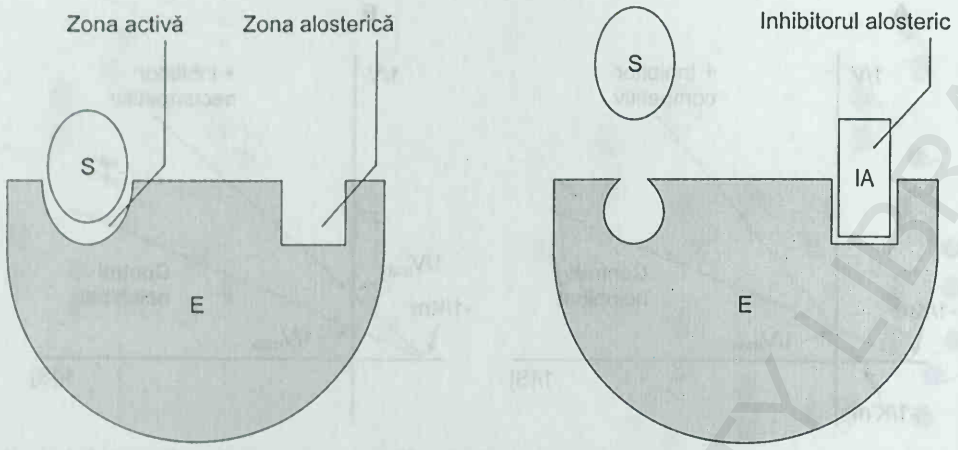


Figura 12.9. Reprezentare schematică a inhibiției alosterice.
Pătrunderea inhibitorului alosteric (IA) în zona alosterică produce modificări conformaționale ale enzimei reducându-i afinitatea față de substratul S.

Administrare pe cale parenterală a enzimelor provenite de la o specie diferită duce la apariția de anticorpi, fenomen care limitează utilizarea L-asparaginazei în terapia leucemiilor sau a streptokinazei ca activator al sistemului fibrinolitic.

S-a descris şi posibilitatea formării de **autoanticorpi față de unele enzime**. De exemplu modificări suferite de factorul XIII la pacienți tratați cu izoniazidă pot duce la apariția de anticorpi față de acestă transglutaminază, iar în cursul lupusului eritematos diseminat pot apare anticorpi față de complexele alcătuite din fosfolipide şi factori ai coagulării cu activitate protează.

Anticorpii dirijați față de citoplasma neutrofilelor (ANCA) reacționează de fapt cu anumite structuri din neutrofil care sunt dotate cu activități enzimatice cum sunt mieloperoxidaza, fosfataza alcalină leucocitară şi elastaza. Relațiile între anomaliile mecanismelor imune şi dereglarea sistemelor enzimatice sunt abia schițate la ora actuală dar se întrevede o participare a unor ast fel de perturbări enzimatice mediate imun în patogeneza unor miopatii şi cardiomiopatii.

12.2. Activitatea enzimatică în celulele vii

Activitatea enzimatică din celule prezintă o serie de particularități care diferă de activitatea enzimatică "in vitro". Astfel, starea de echilibru a unei reacții enzimatice urmărită "in vitro" şi reprezentată prin formula $E + S \Leftrightarrow ES \Leftrightarrow E + P$ nu se poate aplica "in vivo", întrucât produsul de reacție P este mereu îndepărtat din jurul enzimei care poate astfel capta noi molecule de substrat (S). De multe ori produsul unei reacții enzimatice (P) devine substrat într-o altă reacție enzimatică şi aşa mai departe, datorită unei anumite orientări spațiale a enzimelor care asigură un proces metabolic cu mai multe secvențe. Pentru ilustrare este suficient de reamintit secvențele enzimatice ale sintezei de uree, etapele enzimatice ale glicolizei continuate cu ciclul acizilor tricarboxilici, complexele multienzimatice care intervin in sinteza şi degradarea acizilor graşi şi etapele enzimatice ale sintezei de colesterol.

Este de asemenea important de precizat că reacțiile enzimatice din celulele vii pot fi modulate prin intervenția unor mecanisme de reglare dependente de hormoni sau sub acțiunea unor metaboliți celulari specifici, cu efecte locale (prostaglandinele, AMP-ciclic, derivați de fosfatidilinositol). Creşterea sau limitarea unei activități enzimatice intracelulare se poate realiza fie prin modificarea eficienței fiecărei molecule de enzimă, fie prin modificarea vitezei de sinteză sau de degradare a moleculei de enzimă cu implicații asupra numărului de enzime eficiente.

Pe baza acestor considerente este necesară o scurtă trecere în revistă a datelor din literatură privind distribuția intracelulara a enzimelor şi a achizițiilor recente privind mecanismele de reglare a activităților enzimatice în organism.

12.2.1. Distribuția intracelulară a enzimelor

Cunoaşterea localizării enzimelor la nivelul diferitelor organite celulare este necesară nu numai pentru o mai bună înțelegere a modului în care sunt dirijate procesele metabolice dar şi pentru interpretarea unor rezultate furnizate de

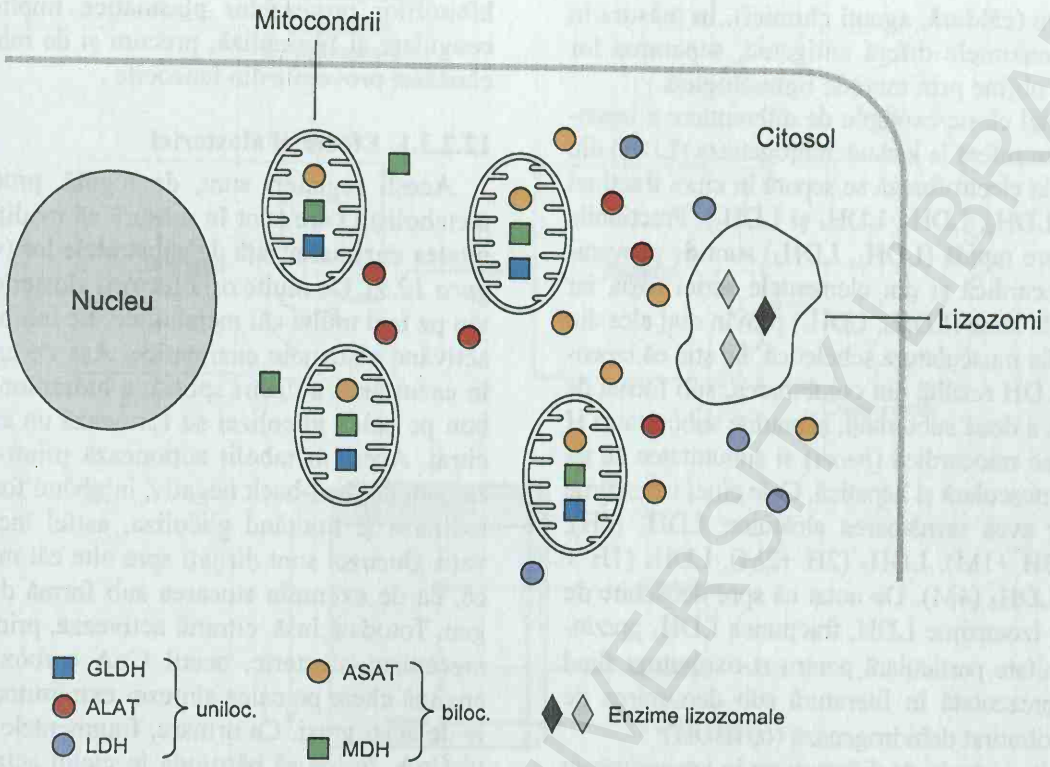


Figura 12.10. Reprezentarea schematică a localizărilor intracelulare ale enzimelor.

laboratorul clinic. De fapt, creşterea în ser a unor enzime provenite din mitocondrii sugerează că leziunea celulară este mai severă decât în cazul în care creşterea se limitează la enzime citoplasmatice ieşite din celulă datorită creşterii permeabilităţii celulare. S-a putut demonstra că enzimele care intervin în glicoliză sunt localizate în citoplasmă, pe când enzimele cu rol în ciclul acizilor tricarboxilici, enzimele lanţului respirator şi cele implicate în fosforilarea oxidativă se află la nivelul mitocondriilor. Tot în mitocondrii se găseşte şi glutamatdehidrogeneza (GLDH).

Pentru practica medicală este important de precizat că alanin-aminotransferaza (ALAT) se găseşte doar în citoplasmă (enzimă uniloculară) pe când asparat-aminotransferaza (ASAT) şi malat-dehidrogenaza (MDH) se află atât în citoplasmă cât şi în mitocondrii. Tehnici imunochimice au putut chiar diferenţia între ASAT citoplasmatic (cASAT) şi enzima mitocondrială (mASAT) creşterea în ser a acesteia din urmă indicând o leziune mai severă a celulelor.

La nivelul lizozomilor se găsesc enzime cu rol în degradarea lipidelor, proteinelor şi acizilor nucleici (colesteril-ester-hidrolază acidă, dezoxiribonuclează, fosfatază acidă, proteaze, colagenaze, beta-glicuronidază etc) (*Figura 12.10*).

Pentru interpretarea modificărilor survenite în privinţa activităţii serice a enzimelor, este important de precizat că echipamentul enzimatic al celulelor diferă de la organ la organ. Aşa de exemplu ASAT se află mai ales în miocard şi ficat precum şi în cantităţi cu ceva mai reduse în fibra musculară striată, în timp ce ALAT se găseşte mai ales în ficat. Creatinkinaza (CK) provine din musculatura scheletică şi din miocard, iar LDH poate proveni din ficat, miocard şi musculatura scheletică. In aceeaşi ordine de idei trebuie arătat că amilaza serică poate avea ca sursă atât pancreasul cât şi glandele salivare, iar fosfataza alcalină creşte în ser atât în unele boli osoase cât şi în afectiuni hepatice. Proveniența unei activităţi enzimatice în ser poate fi însă precizată prin analizarea componenței izoenzimelor.

12.2.2. Variante ale enzimelor. Izoenzime

Izoenzimele sunt forme moleculare, distincte din punct de vedere fizic, cu aceeaşi activitate catalitică. Pe baza acestor proprietăţi fizice diferite, izoenzimele pot fi diferenţiate şi eventual separate. Astfel de proprietăţi sunt încărcarea electrică şi implicit migrarea electroforetică, comportarea diferită la separări cromatografice şi susceptibilitatea diferită la diverse procedee de

inactivare (căldură, agenți chimici). În măsura în care izoenzimele diferă antigenic, separarea lor se poate obține prin metode imunologice.

Cel mai clasic exemplu de diferențiere a izoenzimelor se referă la lactatdehidrogenaza (LDH) din ser care la electroforeză se separă în cinci fracțiuni (LDH_1, LDH_2, LDH_3, LDH_4 și LDH_5). Fracțiunile de migrare rapidă (LDH_1, LDH_2) sunt de proveniență miocardică și din elementele seriei roșii, iar fracțiunile lente (LDH_4, LDH_5) provin mai ales din ficat și din musculatura scheletică. Se știe că izoenzimele LDH rezultă din combinarea, sub formă de tetramer, a două subunități, și anume subunitatea H de origine miocardică (*heart*) și subunitatea M de origine musculară și hepatică. Cele cinci izoenzime LDH ar avea următoarea alcătuire: LDH_1 (4H), LDH_2 (3H +1M), LDH_3 (2H +2M), LDH_4 (1H + 3M) și LDH_5 (4M). De notat că spre deosebire de celelalte izoenzime LDH, fracțiunea LDH_1 prezintă o afinitate particulară pentru α-oxobutirat fiind uneori prezentată în literatură sub denumirea de α-hidroxibutirat dehidrogenază (αHBDH).

Un alt exemplu de diferențiere în izoenzime cu importanță pentru diagnosticul de laborator este în cazul creatininei (CK sau CPK). Această enzimă este alcătuită din două subunități și anume B din creier (brain) și M din musculatură. Izoenzima CK-BB se află în creier, izoenzima CK-MM se găsește în musculatura striată și în miocard, iar izoenzima CK-MB provine doar din miocard fiind specifică acestui țesut și având deci o valoare deosebită în diagnosticul infarctului miocardic.

S-a reușit separarea de izoenzime și în cazul fosfatazei alcaline, α-amilazei, fosfatazei acide, colinesterazei serice etc.

12.2.3. Reglarea activităților enzimatice

Se cunosc până în prezent trei mecanisme principale prin care activitatea enzimelor din organism poate fi modulată în funcție de necesități: un prim mecanism este cel alosteric menționat anterior, un al doilea mecanism general constă din posibilitatea trecerii din formă inactivă de zimogen în enzimă activă; cel de al treilea mecanism depinde de capacitatea celulelor de a regla numărul de molecule dotate cu proprietăți enzimatice, fie prin modificarea vitezei de sinteză a enzimelor, fie prin modificări ale gradului de inactivare sau degradare a acestora. La aceste mecanisme cu caracter general se mai poate adăuga posibilitatea de reglare a concentrației inhibitorilor proteazelor plasmatice implicate în coagulare și fibrinoliză, precum și de inhibare a elastazei provenite din leucocite .

12.2.3.1. Efectorii alosterici

Acești reglatori sunt, de regulă, produși de metabolism care sunt în măsură să modifice afinitatea enzimelor față de substratele lor (vezi *Figura 12.9*). De multe ori efectorii alosterici intervin pe mai multe căi metabolice, fie inhibând, fie activând sistemele enzimatice. Așa de exemplu, în cazul unei utilizări sporite a hidraților de carbon pe calea glicolizei se formează un exces de citrat. Acest metabolit acționează printr-un mecanism de feed-back negativ, inhibând fosfofructokinaza și limitând glicoliza, astfel încât derivații glucozei sunt dirijați spre alte căi metabolice, ca de exemplu stocarea sub formă de glicogen. Totodată însă, citratul activează, prin același mecanism alosteric, acetil CoA carboxilaza, o enzimă cheie pe calea sintezei extramitocondriale de acizi grași. Ca urmare, fragmentele de acetil-CoA, în loc să pătrundă în ciclul acizilor tricarboxilici, iau calea sintezei de lipide. Efectul net al citratului, ca efector alosteric, este deci acela de a opri glicoliza și de a devia procesele metabolice spre stocarea de energie sub formă de glicogen și de lipide.

Un alt exemplu relevant este dat de o stare caracterizată printr-o carență de hidrați de carbon, urmată de o utilizare sporită a grăsimilor și de producerea unui exces de acetil-CoA. Acest metabolit devine un activator alosteric al piruvatcarboxilazei, o enzimă cheie pe calea gluconeogenezei având drept efect producerea de glucoză necesară sistemului nervos și compensând parțial carența alimentară de glucide.

12.2.3.2. Formarea de enzime active din precursori inactivi

Principalele mecanisme care asigură formarea de enzime active din precursori inactivi sunt reprezentate de proteoliza limitată și de procesele de fosforilare sau defosforilare.

Proteoliza limitată intervine în cazul anumitor enzime proteolitice cu rol în digestie sau implicate în hemostază. Astfel de enzime sunt produse și secretate sub formă de precursori inactivi (proenzime sau zimogeni) și poartă denumiri alcătuite din atașarea prefixelor *pre* sau *pro*, sau respectiv a sufixului *ogen*, la numele enzimei.

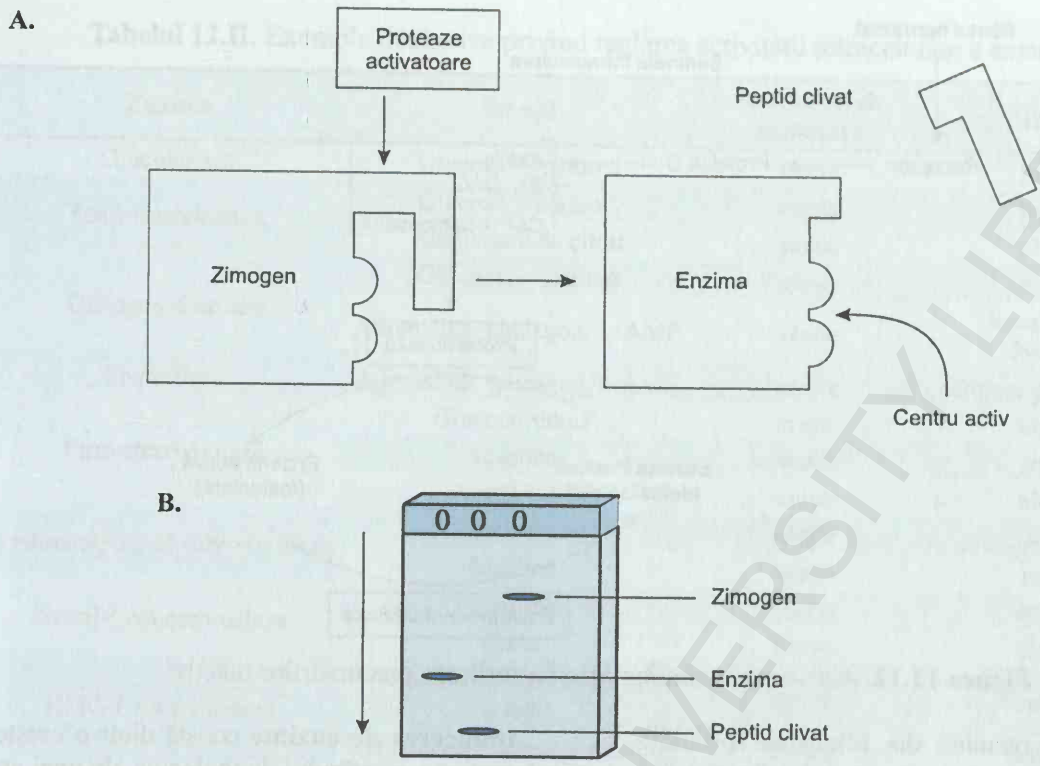


Figura 12.11. Activarea zimogenilor prin proteoliză limitată.
A. Sub acțiunea unei proteaze activatoare are loc clivarea unui peptid din molecula de zimogen, "demascându-se" astfel centrul activ al enzimei și respectiv transformarea zimogenului în enzimă. **B.** Electroforeza în gel de poliacrilamidă conținând dodecilsulfat de sodiu, permite separarea moleculelor proteice și peptidice în funcție de greutatea lor moleculară. Se poate astfel demonstra desprinderea peptidului de clivare și reducerea greutății moleculare a enzimei față de cea a zimogenului din care provine.

Conversia zimogenilor în enzime active este catalizată de enzime proteolitice care prin clivarea unui fragment peptidic duc la "demascarea" centrului activ al enzimei. Este evident că prin îndepărtarea peptidelor clivate greutatea moleculară (GM) a enzimei este mai redusă decât a zimogenului precursor (*Figura 12.11)*. Așa de exemplu pepsinogenul are o GM de 42 kDa în timp ce pepsina are abia 35,4 kDa, iar plasminogenul cu GM de 92 kDa trece sub acțiunea activatorilor săi în plasmină cu o greutate moleculară de 83 kDa.

Redăm mai jos câteva exemple de activare prin proteoliză limitată:

pepsinogen $\xrightarrow{H^+ \text{ sau pepsină}}$ pepsină;

tripsinogen $\xrightarrow{\text{tripsină sau enterokinază}}$ tripsină;

chimotripsinogen $\xrightarrow{\text{tripsină}}$ chimotripsină;

prekalikreină $\xrightarrow{\text{XIIa}}$ kalikreină;

protrombină $\xrightarrow{\text{Xa, } Ca^{2+}\text{, fosfolip. V}}$ trombină;

plasminogen $\xrightarrow{\text{activatori}}$ plasmină.

Așa cum se poate vedea din exemplele de mai sus activarea unor zimogeni și în special a pepsinogenului și a tripsinogenului poate fi catalizată de către însăși forma activă a enzimei, iar un astfel de proces, denumit autocatalitic, decurge cu o viteză crescândă, pe măsură ce tot mai multe molecule de zimogen devin enzime cu capacitatea de a activa.

Fosforilarea precursorilor inactivi intervine în numeroase reacții enzimatice. Un exemplu clasic este acela al fosforilazei, enzima care inițiază procesul de glicogenoliză. Așa cum se vede din *Figura 12.12* sub acțiunea unei fosforilazokinaze, o enzimă din grupa proteinkinazelor, forma inactivă de fosforilază b trece în formă fosforilată activă, denumită fosforilaza a (fosfofosforilaza).

De menționat că proteinkinazele acționează prin transferul de grupări fosfat pe diverse proteine (de regulă pe radicali serină, treonină sau tiozină ai acestor proteine) și că activitatea acestor enzime poate fi modulată de AMP ciclic, de complexul Ca^{2+}-calmodulină, de prostaglandine precum

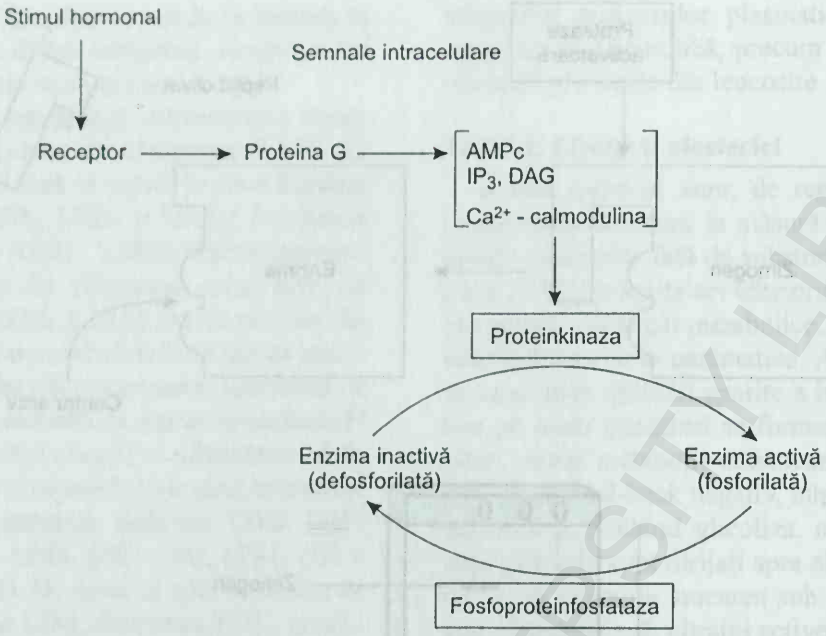


Figura 12.12. Activarea enzimelor prin fosforilarea precursorilor inactivi.

și de produșii rezultați din scindarea fosfatidilinozitolilor din membranele celulare, de către fosfolipaza C. Modificările funcționale, declanșate sub acțiunea proteinkinazelor sunt tranzitorii, datorită defosforilării proteinelor sub acțiunea unor fosfoproteinfosfataze (*Figura 12.12).*

De notat însă că anumite enzime, ca de exemplu glicogen sintetaza se inactivează prin fosforilare. Așa se face că în urma stimulării hepatocitelor cu glucagon, și a eliberării mesagerului intracelular, reprezentat de AMPc, are loc activarea unei proteinkinaze care fosforilează atât fosforilaza b, trecându-o spre forma activă de fosforilază a, cât și glicogensintetaza care devine inactivă. Rezultanta finală a acestor procese este o creștere marcată a eliberării de glucoză din depozitele de glicogen.

Se știe astăzi că între stimulul hormonal și procesele enzimatice mai sus amintite se interpun receptori celulari pentru hormoni precum și așa-zisele proteine G. Descrierea detaliată a transmiterii stimulilor la efectori se va face în *Capitolul 14.*

12.2.3.3. Reglarea sintezei de enzime

Reglarea unei anumite reacții enzimatice se poate realiza și prin modificarea numărului de molecule dotate cu proprietatea catalitică respectivă. Această reglare se află sub controlul aparatului genetic al celulei și se efectuează prin procesele de inducere, represie și derepresie.

Inducerea de enzime constă dintr-o creștere adaptativă a numărului de molecule ale unei anumite enzime, fie ca urmare a unei accelerări a vitezei de sinteză, fie prin reducerea vitezei de degradare. Procesul este declanșat de prezența în mediu a unei substanțe denumită inductor și care, de multe ori, este chiar substratul enzimei. De exemplu, lactoza induce sinteza de betagalactozidază în anumite bacterii.

Represia constă din reducerea numărului de molecule de enzimă ca urmare a prezenței în mediu a unei substanțe specifice denumită corepresor, iar **derepresia** este termenul folosit pentru a indica creșterea moleculelor de enzimă ca urmare a scoaterii din mediu a corepresorului. Adeseori produșii reacției catalizate de o anumită enzimă acționează în calitate de corepresori, limitând sinteza respectivei enzime sau accelerând degradarea ei. De exemplu, sinteza de triptofansintetază de către E.Coli este reprimată de prezența în mediu a triptofanului, adică a produsului reacției catalizate de enzima amintită mai sus. Pe de altă parte, absența din mediu a triptofanului cu rol de corepresor duce la derepresia triptofansintetazei și respectiv la creșterea numărului de enzime dotate cu proprietatea de a produce triptofan.

Deși inducerea, represia și derepresia de enzime au fost inițial descrise la microorganisme, aceste mecanisme intervin și la animalele superioare, având un rol esențial în reglarea metabolismelor. S-a putut demonstra că un anumit induc-

BUASVM TIMIȘOARA UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 12.II. Exemple ilustrative privind reglarea activității intracelulare a enzimelor

Enzima	Stimul	Modificarea activității	Mecanism
Glucokinază	Glucoză + insulină	crește	inducere
Fosfofructokinaza	Glucoză + insulină	crește	inducere
	Acumulare de citrat	scade	alosterie
Glicogen sintetaza	Glucoză + insulină	crește	inducere
	Adrenalină, glucagon, L-AMP	scade	inactivare prin fosforilare
Fosforilaza	Adrenalină, glucagon, c-AMP	crește	activare prin fosforilare
Piruvatcarboxilaza	Glucocorticoizi	crește	inducere
	Insulina	scade	represie
	Acetil-CoA	crește	alosterie
Fosfoenolpiruvat carboxikinaza	Glucocorticoizi	crește	inducere
	Insulină	scade	represie
Acetil-CoA carboxilaza	Insulină	crește	inducere
	Citrat	crește	alosterie
HMG-CoA reductaza	Acumulare de colesterol în celulă	scade	represie
	Depleția de colesterol a celulei	crește	derepresie
Diverse aminotransferaze	Glucocorticoizi	crește	inducere
	Insulină	scade	represie
Protrombina	Factor Xa, fosfolipide, calciu, factor V	crește (trece în trombină)	proteoliză limitată
Plasminogen	Activator tisular	crește (trece în plasmină)	proteoliză limitată

tor poate stimula sinteza mai multor enzime înrudite, respectiv implicate în același lanț metabolic și că nu numai diversele substrate specifice dar și o serie de hormoni pot îndeplini funcția de inductori. Așa de exemplu glucoza și insulina induc sinteza enzimelor implicate în utilizarea glucozei (glucokinaza, fosfofructokinaza, piruvatkinaza, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza) sau în formarea de glicogen (glicogensintetaza). Totodată glucoza și insulina reprimă enzimele cu rol în gluconeogeneză (piruvat carboxilaza, fosfoenolpiruvat-carboxikinaza), a căror sinteză este însă stimulată de hormonii glucocorticoizi.

În *Tabelul 12.II* sunt redate câteva exemple ilustrative privind situații care duc la modificarea unor anumite reacții enzimatice precum și mecanismele implicate în producerea respectivelor modificări.

12.2.3.3.1. Mecanisme moleculare implicate în inducere, represie și derepresie

Spre deosebire de creșterile activităților enzimatice produse prin mecanism alosteric, sau ca urmare a trecerii din zimogen în enzimă și care devin evidente în decurs de secunde, modificarea unei activități enzimatice inductibile implică o perioadă de latență care corespunde timpului necesar pentru sinteza de noi molecule de enzimă. De altfel blocarea sintezei de acid ribonucleic mesager (ARNm) cu actinomicină D, sau blocarea sintezei de proteine prin cicloheximidă și puromicină, opresc procesul de inducere a unei activități enzimatice.

Se consideră că sub acțiunea agentului inductor, are loc într-o primă etapă o accelerare a procesului de transcriere, respectiv de formare a ARNm după tiparul de ADN al genei de structură care codifică respectiva enzimă (*Figura 12.13).*

Acumularea de ARNm la nivelul ribozomiior duce ulterior la stimularea sintezei de proteinezimă prin procesul de translație după modelul oferit de ARNm. Ca în orice sinteză de proteine, sinteza enzimei la nivelul ribozomal implică o inițiere a procesului, urmată de elongare progresivă și de terminare la nivelul adecvat a lanțului peptidic. Există dovezi că procesul de inducere poate fi influențat la nivel posttranscripțional fie

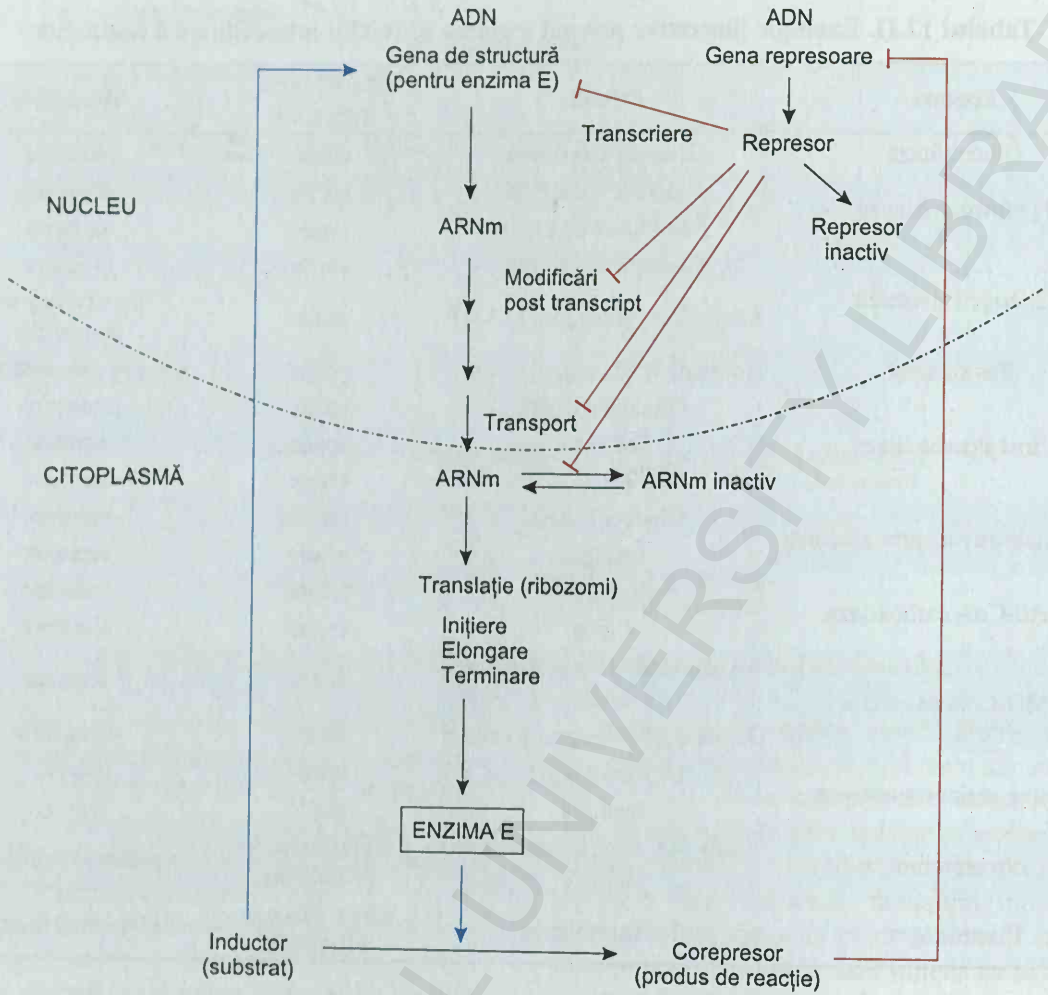


Figura 12.13. Reprezentare schematică a inducerii şi represiei unei enzime E.
Substratul enzimei actionează ca inductor, se fixează pe acidul desoxiribonucleic (ADN) din nucleu şi inițiază formarea de acid ribonucleic mesager (ARNm) specific pentru enzima E; la nivelul ribosomilor are loc translația şi inițierea sintezei de enzimă. Pe de altă parte, produşii reacției catalizate de enzima E, determină la nivelul genei reglatoare sinteza de represor care limitează producerea enzimei E la diverse nivele (transcriere, posttranscriere, la transportul prin membrana nucleară şi eventual accelerând inactivarea ARNm. De notat că substratul poate interveni şi prin inactivarea represorului producând fenomenul de derepresie. Linia plină indică calea procesului de inducere, iar linia întreruptă se referă la căile prin care se reprimă sinteza enzimei.

în sensul unei stabilizări a ARNm, fie în sensul unei degradări sau inactivări a acestuia.

Mecanismele care pot interveni în modifcările postranscripționale ale ARNm implică clivări, metilări, poliadenilări şi fixări ale ARNm pe anumite proteine. În cazul proceselor de inducere mediate de hormoni, de exemplu cortizol, inițial este necesară o fixare a hormonului pe receptori specifici ai celulei țintă, urmată de internalizarea complexului receptor-hormon, care acționează la diverse nivele stimulând transcrierea, influențând fenomenele posttranscripționale şi în anumite situații inactivând represorul. Complexitatea acestor mecanisme care implică mai multe etape, fiecare etapă supusă unui control specific, ar putea explica spectrul larg de acțiune al glucocorticoizilor care include atât efecte anabolice cât şi catabolice în funcție de țesutul țintă. Aşa de exemplu cortizolul stimulează sinteza de proteine în ficat, dar exercită un efect catabolic asupra țesutului limfoid, deşi induce sinteza de aminotransferaze în ambele țesuturi.

12.2.3.3.2.Implicații medicale ale inducerii de enzime microsomiale

Pe lângă efectele mai sus menționate privind rolul proceselor de inducere şi derepresie în controlul metabolismelor, există suficiente dovezi că inducerea de enzime joacă un rol important în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

metabolizarea medicamentelor şi în răspunsul organismului la diverse medicamente. Pe de altă parte, o serie de medicamente acționează ca inductori, iar efectele lor de sporire a activității anumitor sisteme enzimatice se repercută nu numai asupra metabolizării respectivelor medicamente ci şi asupra altor metabolisme.

Lista agenților inductori este lungă şi în continuă proliferare. Ea include medicamente anticonvulsivante (fenobarbital, fenitoină), antifungice (griseofulvină), antibiotice (rifampicina), antiinflamatorii (aminopirina, fenilbutazona), anticoagulante (warfarina), agenți de adicție (alcool şi marijuana), contraceptive orale (progesteron), pesticide (DDT), hidrocarburi policiclice (din fumul de țigară, din carnea de grătar).

Ficatul este principalul organ în care au loc procesele de inducere sub acțiunea agenților mai sus amintiți, dar astfel de mecanisme de inducere enzimatică au putut fi demonstrate în placentă, în intestin şi în limfocite.

Literatura medicală insistă asupra **sistemului microsomal de hidroxilare a medicamentelor** cunoscut şi sub denumirea de **sistem al oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte**. Reacțiile catalizate de aceste enzime includ hidroxilări ale unor structuri alifatice sau aromatice, demetilări, dehalogenări precum şi glicuronoconjugări. Efectele esențiale ale acestor reacții constau în transformarea unor substanțe străine organismului (xenobiotice) din forma liposolubilă în forme hidrosolubile mai uşor de eliminat pe cale renală sau biliară. Ca urmare, sistemele enzimatice mai sus amintite necesită prezența de O_2, din care un atom este utilizat pentru hidroxilarea xenobioticului iar celălalt pentru generarea de H_2O împreună cu hidrogenul cedat de $NADPH_2$ sau $NADH_2$. Totodată, la asigurarea fluxului de electroni necesari pentru reducerea atomului de oxigen contribuie citocromoxidoreductaza (EC 1.6.99.3) şi un grup de citocromi, dintre care mai bine caracterizați sunt citocromii P450 şi P448 (denumiți astfel după lungimea de unde de 450 nm şi respectiv 448 nm la care prezintă un maxim de absorbție).

Există o serie de implicații cu importanță pentru medicină a inducerii oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte.

1. În primul rând sporirea accentuată a capacității de hidroxilare, are drept urmare o metabolizare şi implicit o eliminare mai rapidă atât a medicamentului care a indus sistemul enzimatic şi a altor xenobiotice. Astfel subiecții tratați cronic cu fenobarbital metabolizează mai rapid anticoagulantele cumarinice, tolbutamida, aminopirina, fenilbutazona, clorpromazina, fenitonina şi digitoxina.

2. Inducerea prin fenobarbital a bilirubinglicuronil-transferazei accelerează procesul de glicuronconjugare a bilirubinei şi are efecte favorabile asupra hiperbilirubinemiilor indirecte (neonatale, boala Gilbert, sindrom Crigler-Najjar tip II). Totodată inducerea enzimelor care intervin în hidroxilarea acizilor biliari duce la creşterea solubilității în apă a acestora şi implicit la creşterea fluxului biliar apos, cu repercusiuni favorabile asupra fenomenelor de colestază intrahepatică.

3. Pe de altă parte, inducerea cauzată de fenobarbital poate avea efecte nedorite cum sunt metabolizarea accelerată a vitaminei D şi a metaboliților biologic activi ai acesteia, ceea ce favorizează dezvoltarea rahitismului şi osteomalaciei sau accentuarea osteoporozei. Inducerea oxidoreductazelor accelerează şi hidroxilarea hormonilor steroizi (androgeni, estrogeni, progestativi precum şi a glucorticoizilor) dar importanța acestor procese pentru eventuale disfuncții hormonale nu a fost încă dovedită.

4. Agravarea porfiriilor în urma consumului de barbiturice s-ar putea explica prin inducerea de către fenobarbital a citocromului P450 cu structură heminică. Se ajunge astfel la o dirijare sporită a moleculelor de hem spre formarea de citocrom P450 şi la o scădere a rezervelor intracelulare de hem care acționează totodată, în calitate de corepresor al delta-aminolevulinic-sintetazei, la frânarea porfirogenezei. Cu alte cuvinte, inducerea prin fenobarbital a citocromului P450 duce la o derepresie a sintezei de porfirine şi la fenomenele neurologice date de agravarea porfiriilor acute.

5. S-a arătat că o serie de hidrocarburi policiclice îşi sporesc efectul cancerigen prin hidroxilare, în timp ce hidrocarburile aromatice devin mai puțin carcinogene în urma hidroxilării. S-ar părea deci că inducerea sistemului microsomal hidroxilant poate fie accelera, fie încetini creşterea tumorală în funcție de carcinogenul implicat.

6. Consumul cronic de alcool are un efect inductor asupra oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte ceea ce duce nu numai la creşterea propriei sale metabolizări dar şi la accelerarea metabolizării tolbutamidei, antivitaminelor K, barbituricelor şi fenitoinei, ceea ce ar putea explica toleranța crescută a alcoolicilor față de sedative. O singură doză mare de alcool inhibă însă metabolizarea substanțelor amintite, ceea ce explică efectele toxice cumulative ale ingestiei

unor doze masive de alcool împreună cu barbiturice. Consumul cronic de alcool duce la creşterea γ-glutamil-transferazei în ser iar sevrajul duce la scăderea activității serice a acestei enzime.

7. Adaptarea nou-născuților la viața extrauterină depinde în mare măsură de maturarea funcțiilor biochimice şi fiziologice în cursul dezvoltării fetale şi există dovezi că hormonii cum sunt glucocorticoizii şi tiroxina contribuie la maturarea funcțiilor biochimice prin inducerea sintezei de enzime. Chiar şi producerea de surfactant la nivelul alveolelor pulmonare şi respectiv maturarea plămânilor implică inducerea enzimei colinfosfotransferază sub acțiunea glucocorticoizilor.

8. Capacitatea sistemelor enzimatice de a răspunde la agenți inductori scade la vârstnici, ceea ce ar putea explica reducerea posibilităților de adaptare a metabolismelor la solicitări sporite.

9. Se ridică şi problema unei posibile intervenții a unor mecanisme de inducere enzimatică în cazul subiecților obezi şi hipertrigliceridemici. De fapt, injectarea intraperitoneală repetată de fenobarbital la iepuri duce la creşterea trigliceridelor serice şi hepatice, iar acest procedeu ca şi alimentația bogată în fructoză induce sinteza de fosfatidat-fosfohidrolază, o enzimă cu rol în producerea trigliceridelor. Pe de altă parte, subiecții obezi şi hipertrigliceridemici prezintă o accelerare a procesului de clearance al antipirinei ceea ce sugerează o amplificare a reticulului endoplasmatic şi o activitate sporită a enzimelor microsomale cu rol în metabolizarea medicamentelor.

10. Detectarea unui proces de inducere a enzimelor microsomale cu mijloacele laboratorului clinic se bazează pe detectarea creşterilor urinare de 6-β-hidroxicortisol şi de acid D-glucaric, pe creşterea activității γ-glutamil-transferazei (o enzimă inductibilă) şi pe accelerarea eliminării din organism a antipirinei administrate.

12.3. Bazele fiziopatologice ale diagnosticului enzimatic

Aşa cum s-a arătat mai sus, majoritatea reacțiilor enzimatice ca şi reglarea acestor procese au loc la nivelul celulelor, iar laboratorul clinic încearcă să contribuie la diagnostic şi la stabilirea prognosticului pe baza determinărilor de enzime în umori şi mai ales în serul bolnavilor. Din acest motiv, este important de stabilit prin ce mecanisme se ajunge la modificarea activităților enzimatice în ser, respectiv în plasmă.

12.3.1. Proveniența enzimelor plasmatice

Din punct de vedere al mecanismului prin care enzimele ajung în plasmă, se pot distinge următoarele categorii:

a. Enzime secretate activ în plasmă. Astfel de enzime sunt secretate mai ales de ficat şi acționează de regulă asupra unor substrate din plasmă îndeplinind la acest nivel un rol fiziologic. În această grupă se includ o serie de factori ai coagulării (protrombina, factorii VII, IX, X, XIII) lecitin-colesterol aciltransferaza (LCAT) cu rol în esterificarea colesterolului din plasmă şi colinesteraza. Insuficiența funcțională a celulelor care produc astfel de enzime se asociază cu scăderea activității plasmatice a enzimelor respective.

b. Enzime ale secrețiilor exocrine. Cea mai mare parte a unor astfel de enzime cum sunt amilaza pancreatică şi salivară, lipaza pancreatică, pepsinogenul gastric şi fosfataza acidă prostatică se varsă în canalele excretoare şi doar o mică fracțiune scapă în limfă şi de acolo în plasmă. Aşa de exemplu, în condiții fiziologice, 98% din α-amilaza produsă în acinii glandulari ai pancreasului ajunge în duoden. Ca urmare, activitatea acestei enzime este de 500-800 ori mai mare în duoden decât în ser. În caz de leziuni al celulelor secretoare sau de obstrucții acute ale canalelor excretoare, partiția exo-endocrină amintită se alterează şi un procent mai mare de enzime trece în limfă şi de acolo în plasmă.

În principiu, atrofia organului producător de enzime ar trebui să ducă la o scădere a activității serice a enzimelor din această categorie, dar insuficența funcțională a celulelor producătoare poate fi mai bine evaluată în produsul de secreție (respectiv în sucul duodenal în cazul α-amilazei pancreatice).

c. Enzime celulare. Astfel de enzime acționează exclusiv intracelular, iar creşterea lor în ser denotă o alterare a membranei celulare, permițându-se astfel "scurgerea" lor in lichidul interstițial, limfă şi plasmă.

Principalele enzime celulare (enzime plasmatice de leziune) utilizate în scop de diagnostic sunt lactat-dehidrogenaza (LDH), alanin-aminoransferaza (ALAT) aspartat-amino-transferaza (ASAT) creatin-kinaza (CK, notată şi CPK) şi glutamat-dehidrogenenaza (GLDH).

Natura enzimei celulare, a cărei activitate creşte în ser, precum şi gradul unei astfel de creşteri depind de:

1. Echipamentul enzimatic al organului lezat. Această noțiune nu trebuie însă absolutizată. Astfel, rinichiul este organul cel mai bogat în γGT, dar în majoritatea cazurilor leziunile renale nu duc la creşteri ale acestei enzime în ser deoarece enzima scursă din tubii renali trece în urină. În schimb ficatul, cu un conținut mai redus de γGT este principala sursă a creşterilor de enzimă în ser.

2. Localizarea intracelulară a enzimelor şi permeabilitatea membranelor celulare şi mitocondriale (*Figura12.10)*.

3. Gradul de vascularizație a organului lezat şi viteza de circulație la nivelul zonelor lezate, de care depinde "spălarea" enzimelor ieşite din celule în lichidul interstițial şi trecerea lor în plasmă.

4. Prezența sau absența unei bariere inflamatorii.

5. Solubilitatea enzimei în lichidul extracelular şi măsura în care celulele lezate vin în contact direct cu plasma. Astfel, datorită contactului intim al hepatocitelor cu sângele circulant, leziunile hepatice permit o deversare rapidă a enzimelor celulare în plasmă. În cazul altor organe, trecerea din celule în sânge decurge mai lent prin intermediul lichidului interstițial şi al limfei.

6. Viteza de degradare şi de eliminare a enzimei celulare ajunsă în plasmă.

7. Numărul de celule lezate şi gradul de afectare al fiecărei celule precum şi viteza cu care s-au produs leziunile.

Pe lângă cele trei categorii de mecanisme care duc la modificări ale activității enzimelor serice, sunt de menționat enzimele indicatoare ale colestazei şi cele care reflectă un proces de inducere.

12.3.2. Eliminarea din plasmă a enzimelor

Se recunosc mai multe mecanisme prin care se ajunge la scăderea activității enzimelor ajunse în plasmă.

În cazul enzimelor cu greutate moleculară relativ mică, ca de exemplu α-amilaza, îndepărtarea se face pe cale urinară. Există de asemenea, indicii că cel puțin o parte a fosfatazei alcaline hepatice se elimină prin bilă.

Scăderea activității creatinkinazei se datorează într-o primă etapă unui proces de oxidare a grupărilor SH din centrul activ al enzimei, procesul fiind însă parțial reversibil printr-o "reactivare" ce poate fi obținută prin adaosul de compuşi conținând grupări SH.

Cea mai mare parte a enzimelor celulare sunt însă îndepărtate din plasmă printr-un proces de captare şi degradare în macrofage. Viteza cu care se produce această îndepărtare variază de la enzimă la enzimă şi prezintă o deosebită importanță diagnostică, întrucât recoltările de sânge efectuate la un timp prea lung de la evenimentul patologic, pot da rezultate negative. Astfel timpul de înjumătățire (T/2) în plasmă este de circa 24-36 ore în cazul ASAT şi de 40-68 ore pentru ALAT. De menționat că izoenzimele LDH_1 şi LDH_2 (tipul miocardic) persistă în plasmă un timp suficient de lung (T/2 = 60-180 ore) spre a avea o valoare diagnostică, pe când izoenzima LDH_5 (tipul muscular şi hepatic) se elimină extrem de rapid (T/2 = 8-12 ore) şi din acest motiv are valoarea diagnostică doar în caz de leziuni supraacute şi deosebit de extinse ale ficatului şi ale musculaturii.

Enzimele de secreție hepatică (colinesteraza, LCAT şi factorii coagulării cu activitate enzimatică) sunt şi ele degradate în organism, iar timpul lor de înjumătățire variază între 10-14 zile, în cazul colinesterazei şi 6-8 ore în cazul factorului VII al coagulării.

12.3.3. Activități enzimatice în urină

Activitătile enzimatice detectabile în urină pot proveni, în principiu, din următoarele surse:

1) filtrare glomerulară a enzimelor din plasmă;

2) remanierea permanentă a celulelor renale, ureterale şi vezicale;

3) creşterea tranzitorie a permeabilității membranei celulelor tubulare renale (de exemplu în cursul unei hipoxii severe);

4) secreții genitale (de exemplu fosfataza acidă din lichidul prostatic);

5) celule sanguine (hematii, leucocite);

6) bacterii.

Cu excepția amilazei pancreatice şi salivare şi a pepsinogenului gastric (uropepsinogen), filtrarea glomerulară a enzimelor din plasmă este limitată de greutatea moleculară ridicată. Ca urmare, valori crescute ale ASAT, ALAT, CK, LDH, γGT şi GLDH în urină pledează pentru leziuni ale celulelor tubulare renale. De fapt creşteri importante ale LDH_1, LDH_2 şi ale γGT se detectează în boli renale acute şi mai ales în caz de rejet al unui transplant renal. Dozările de enzime urinare se practică însă rareori, astfel de determinări nefiind suficient de bine standardizate, respectiv fiind dependente de gradul de diluție al urinei, de variații ale pH urinar şi de eventuala prezență a unor peptide urinare cu efect inhibitor. O importanță mai mare se atribuie creşterii β-N-acetil-glucozo-aminidazei în serul şi mai ales în urina bolnavilor la care se produce o rejecție a rinichiului grefat.

12.4. Valoarea diagnostică a determinărilor de enzime

În *Tabelul 12.III* se prezintă o sinteză privind semiologia principalelor enzime utilizate în scop diagnostic. Detalii privind interpretarea rezultatelor obținute în contextul datelor clinice sunt prezentate în cele ce urmează.

12.4.1. Enzimele serice în infarctul miocardic

Principalele enzime cu valoare diagnostică, în cazul unei ischemii acute a miocardului care poate ajunge până la necroză, sunt CK (CPK) ASAT și LDH. În interpretarea creșterilor în ser a activității acestor enzime trebuie ținut cont de anumite particularități ale procesului patologic și anume: debutul leziunii survine acut; intervalul de timp în care se instalează leziunile este relativ scurt; zona afectată este relativ limitată și localizată; leziunile suferite de fiecare celulă sunt de regulă severe.

Intervalul de timp de la debutul manifestărilor clinice și electrocardiografice pe de-o parte și creșterea semnificativă a activității serice a enzimelor menționate, depinde de decalajul între producerea obstrucției și modificările suferite de celulele ischemiate, ieșirea enzimelor din aceste celule și trecerea lor din lichidul interstițial în circulația sanguină. Ca urmare, așa cum reiese din *Figura 12.14 și Tabelul 12.IV*, creșterile activităților serice ale CK, ASAT și LDH prezintă o anumită dinamică, CK fiind prima enzimă care crește, iar LDH ultima dar cea mai persistentă. Alături de această dinamică diferită, diversele enzime utilizate în diagnosticul infarctului miocardic diferă și în privința specificității, respectiv prin posibilitatea de a prezenta creșteri și în alte stări patologice.

12.4.1.1. Valoarea diagnostică și limitele determinărilor de CK

Avându-se în vedere că musculatura striată este deosebit de bogată în CK, leziunile acestui țesut duc la creșteri ale CK care, în anumite situații, pot preta la confuzii cu modificările cauzate de un infarct miocardic. Așa de exemplu creșteri ale activității serice a CK se pot întâlni în: a) efort fizic excesiv efectuat de persoane neantrenate; b) aplicarea șocurilor electrice în cursul tratamentelor de conversie a unei aritmii, survenită uneori ca o complicație a infarctului miocardic, poate duce, prin contracturi ale musculaturii striate, la creșteri mult mai mari ale CK, decât cele explicabile prin leziunea miocardică; c) hipoxia severă a musculaturii, survenită în stări de șoc (șoc cardiogen în cursul unui infarct miocardic sau șoc hemoragic) poate duce la creșteri accentuate ale CK; d) traumatisme ale musculaturii și chiar anumite injecții intramusculare (tetracicline, peniciline, diazepam și unele antiaritmice) se pot însoți de creșteri moderate ale CK; e) leziunile toxice ale musculaturii (miopatia alcoolică), miopatiile degenerative, hipertermia malignă și dermatomiozitele se asociază de regulă cu valori mult crescute ale CK; f) hipotiroidismul sever se însoțește adeseori de valori crescute ale CK, care revin la normal după tratamentul hormonal substitutiv.

Astfel de confuzii pot fi însă evitate dacă modificările activității serice ale CK sunt interpretate în lumina datelor clinice și mai ales dacă se recurge la determinarea izoenzimei specifice miocardului (CKMB). Așa cum s-a mai arătat (vezi tabel 12.III), se disting trei izoenzime ale CK și anume: CKMM (tipul muscular), CKBB aflată în creier (fără importanță diagnostică) și CKMB de proveniență miocardică. De precizat că miocardul conține atât izoenzima CKMM (aproape 80%) cât și izoenzima CKMB (cu ceva peste 20%) și care este oarecum specifică miocardului. De fapt, o creștere a activității CK la peste dublul limitei superioare a normalului și o valoare a CKMB de peste 5% din activitatea totală a CK sunt sugestive pentru infarctul miocardic.

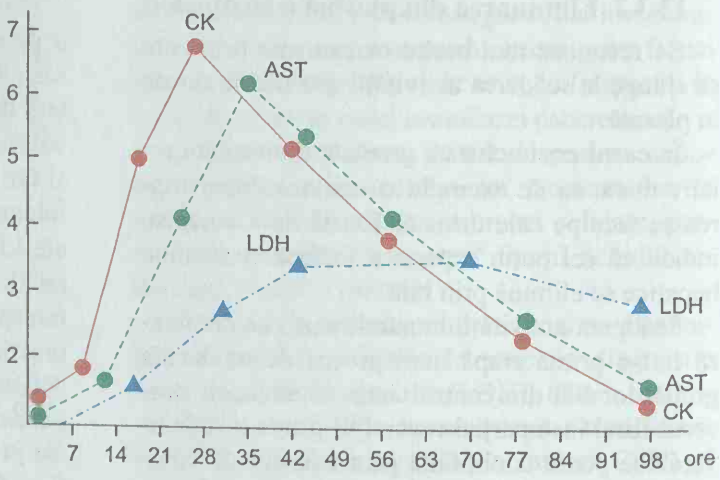


Figura 12.14. Dinamica creșterii activităților CK, AST și LDH în cursul infarctului miocardic.
Pe abscisă - timpul în ore. Pe ordonată - activitatea enzimelor în ser exprimată sub forma de multiplii ai limitei superioare a normalului.

Tabelul 12.III. Semiologia principalelor enzime în diagnosticul de laborator. În paranteză se dau prescurtările utilizate în mod uzual.

Enzima	Proveniență	Modificări patologice	Observații
Aspartat aminotransferază (AST, ASAT)	ficat, miocard, mușchi, mici cantități în plămâni, rinichi, pancreas, eritrocite	**Creșteri marcate:** infarct miocardic, hepatită acută, leziuni toxice ale ficatului **Creșteri moderate:** hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare	În ficat: 60% în citosol; 40% în mitocondrii
Alanin-aminotransferază (ALT, ALAT)	citosolul hepatocitelor, mici cantități în rinichi, pancreas, miocard, mușchi	**Creșteri marcate:** hepatită acută și leziuni toxice ale ficatului **Creșteri moderate:** hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare	Localizată mai ales în hepatocitele de la periferia lobului hepatic
Lactat dehidrogenază (LDH)	musculatură, ficat, miocard, rinichi, eritrocite	**Creșteri marcate:** infarct miocardic, leziuni toxice ale ficatului, anemie megaloblastică, cancer testicular **Creșteri moderate:** boli musculare, hemoliză, limfoame maligne, sindrom mieloproliferativ	Se disting 5 izoenzime: LDH_1, LDH_2 cresc în infarct miocardic și anemie megaloblastică LDH_4, LDH_5 cresc în boli musculare și leziuni acute ale ficatului
Creatinkinaza (CK, CPK)	musculatură, miocard, creier	**Creșteri importante:** infarct miocardic, distrofie musculară progresivă, dermatomiozite rabdomioliză **Creșteri moderate:** injecții intramusculare cu diazepam, tetracicline; hipotiroidism	S-au evidențiat 3 izoenzime: dimerice CKMM - musculară CKMB - specifică miocardului CKBB - din creier
Glutamat dehidrogemază	ficat, mici cantități în rinichi, plămâni, miocard	Creșteri în leziuni severe (necrotizante) ale hepatocitelor	Enzimă mitocondrială (uniloculară)
α-amilaza	glande salivare, pancreas	**Creșteri importante:** pancreatita acută **Creșteri moderate:** parotidită, ulcer perforat, insuficiență renală, opiacee, colici biliare, macroamilazemie	S-au evidențiat izoenzime pancreatice și salivare. Amilaza se elimină prin urină
Fosfataza alcalină (ALP)	ficat, oase, duoden, rinichi	**Creșteri:** colestază, boli osoase asociate cu reacție osteoblastică **Scăderi:** hipofosfatazie genetică, mixedem, acondroplazie	Se disting izoenzime osoase, hepatice, intestinale
Fosfataza acidă (AcP)	prostată, eritrocite, plăcuțe, rinichi, ficat	**Creșteri:** carcinom de prostată cu depășirea capsulei; uneori în carcinoame mamare cu metastaze osoase	Enzima este instabilă. Izoenzima prostatică este tartrat inhibabilă
γ-glutamil-transferaza (γGT, GGT)	rinichi, pancreas, ficat	**Creșteri importante:** colestază, alcoolism, tumori hepatice **Creșteri moderate:** hepatite cronice, pancreatite, tratament cronic cu barbiturice	Enzimă inductibilă
Colinesteraza (CHE)	secretată activ de către hepatocite	**Scăderi importante:** ciroză hepatică, intoxicații cu organofosforice **Scăderi moderate:** denutriție, hipotiroidism, anemii severe, reacție de fază acută **Creșteri:** sindrom nefrotic, obezitate androidă, diabet tip 2.	S-au descris mutații care afectează activitatea CHE și mai ales deficit de hidroliză a succinilcolinei

12.4.1.2. Utilitatea determinărilor de ASAT

Deși activitatea serică a acestei enzime crește în mai mică măsură decât CK, explorarea comportării ASAT nu și-a pierdut utilitatea. De fapt, spre deosebire de CK, ASAT crește mai puțin în afecțiunile musculaturii. Se consideră astfel utilă stabilirea raportului CK/ASAT care, în cazul unui infarct miocardic este în medie de 5 (de exemplu CK = 500 U/L; ASAT = 100 U/L) pe când într-o leziune a musculaturii striate acest raport depășește valoarea de 10, fiind în medie de 27. trebuie însă avut în vedere că ASAT poate crește în infarctul pulmonar, precum și în boli hepatice. În astfel de situații nu se ajunge însă la creșteri de CK.

12.4.1.3. Rolul determinărilor de LDH

Creșterile LDH survin mai târziu decât în cazul CK și ASAT dar persistă mai mult timp (*Figura 12.14*). Din acest motiv determinările de LDH (în special izoenzimele LDH_1 și LDH_2) își găsesc utilitate în cazurile care, din diverse motive, ajung să fie investigate doar după câteva zile de la instalarea leziunilor miocardice. De notat importantele creșteri ale LDH_1 și LDH_2 survenite la bolnavii cu anemie megaloblastică.

Tabelul 12.IV. Comportarea în dinamică a activităților CK, AST și LDH în infarctul miocardic. Modificat după Schmidt și Schmidt (27).

Enzimă serică	Interval de timp de la debut			Creștere maximă (multiplii ai limitei superioare a normalului)	Observații
	până la detectarea unor creșteri cu valoare diagnostică	până la atingerea valorilor maxime	până la normalizarea valorilor		
CK (CPK)	4-8 ore	16-36 ore	3-6 zile	7 (2-25)	Izoenzima CKMB este mai specifică pentru miocard
AST (ASAT)	6-10 ore	18-48 ore	3-6 zile	6 (2-14)	AST (dar nu și CK) poate crește în infarctul pulmonar
LDH	8-14 ore	24-60 ore	7-15 zile	3,3 (2-8)	Izoenzimele LDH_1 și LDH_2 sunt mai specifice pentru miocard

12.4.1.4. Rolul determinărilor de enzime în diagnosticul complicațiilor infarctului miocardic

Determinările de enzime pot furniza și relații cu privire la o eventuală insuficiență acută a inimii drepte survenită ca o complicație a infarctului miocardic sau în caz de embolie pulmonară. De fapt, congestia hepatică, instalată rapid într-o astfel de situație, duce la creșterea în ser a unor enzime care indică o leziune hepatică (ALAT, LDH_{4-5}) și care pot fi greșit interpretate ca fiind cauzate de o hepatită acută virală. Totodată, staza hepatică ca și modificările proteosintezei hepatice, consecutive reacției de fază acută explică și scăderea moderată a activității colinesterazei serice, constatată adeseori în zilele și chiar săptămânile care urmează unui infarct miocardic sever.

De asemenea, în cazul instalării șocului cardiogen și implicit a unei hipoxii generalizate, care interesează și musculatura striată, se ajunge la o creștere exprimată a CK (izoenzima CKMM) și a LDH_{4-5}.

12.4.1.5. Evaluarea critică a comportării enzimelor serice în infarctul miocardic și în alte boli ale miocardului

De regulă, modificările ECG preced creșterea enzimelor de leziune, astfel încât determinările de CK (CPK), ASAT și LDH vin doar să confirme diagnosticul și eventual să evalueze extinderea leziunii. Există însă și situații în care semnele clinice și electrocardiografice nu sunt suficient de concludente. Astfel de condiții pot surveni în cazul microinfarctelor diseminate, în caz de preexistență a unei hipertrofii miocardice, în caz de persistență pe ECG a unor sechele ale unui infarct anterior, în bloc de ramură sau sindrom Wolf-Parkinson-White. De subliniat că o reinfarctare poate fi ușor decelată de CPK, ASAT și LDH, pe când recunoașterea unui astfel de proces prin examinări ECG întâmpină dificultăți. O situație particulară constă din așa-zisul infarct silențios, adică survenit în absența fenomenelor dureroase. În vederea depistării unor astfel de cazuri se recomandă investigațiile ECG și dozări de enzime ori de câte ori se constată instalarea bruscă a unei insuficiențe cardiace, episoade de dispnee acută, aritmii sau edem pulmonar.

O problemă mult dezbătută este aceea a posibilității de a evalua extinderea leziunii miocardice și implicit prognosticul unui infacrt miocardic pe baza determinărilor de enzime. De fapt, prin determinări seriate de CKMB se pot face aprecieri asupra extinderii leziunii și implicit asupra riscului instalării unei insuficiențe de pompă. Nu trebuie însă uitat că gravitatea și prognosticul unui infarct miocardic depind nu numai de extinderea leziunii dar și de localizarea ei. De fapt, infarcte cu extinderea relativ redusă dar afectând sistemul excitocoducător se pot solda cu deces încă din primele ore de la debut, când nivelul activității enzimelor din ser nu a ajuns încă la valori semnificativ crescute.

Pe de altă parte, terapia trombolitică care asigură o repermeabilizare a coronarei trombozate și o reperfuzie a miocardului, se însoțește de o creștere deosebit de exprimată a enzimelor menționate, datorită "spălării" acestora din zona de leziune și a trecerii lor în cantitate sporită și în ritm accelerat în torentul circulator. În astfel de situații,

creşterea deosebit de accentuată a CK şi ASAT contrastează cu evoluția, de regulă, favorabilă.

În aşa-zisa "angină instabilă" cauzată de procese trombotice parietale, care nu produc o ocluzie completă a unei ramuri a arterelor coronare, creşterile de CK şi ASAT sunt puțin exprimate. Determinările acestor enzime trebuie însă efectuate seriat spre a se putea surprinde o eventuală trecere spre un infarct miocardic.

Miocarditele duc la creşteri ale CK, ASAT şi LDH doar atunci când au o evoluție deosebit de acută şi evoluează cu procese necrotice diseminate. De notat că apariția bruscă a unei insuficiențe cardiace, în contextul unei miocardite, se poate solda cu eliberarea de ALAT şi LDH_{4-5} din ficatul brusc congestionat. Este de precizat că hepatocitele din centrul lobului hepatic, adică cele aflate în jurul venei centrolobulare, sunt deosebit de bogate în LDH şi totodată sunt cele mai afectate de o congestie hepatică rapid instalată.

Insuficiența cardiacă dezvoltată lent şi progresiv nu se însoțeşte de modificări apreciabile ale ASAT, ALAT şi LDH. S-a constatat însă o scădere progresivă a activității colinesterazei serice (CHE), denotând o reducere a capacității proteosintetice a ficatului ca urmare a stazei şi hipoxiei, iar enzimele indicatoare ale colestazei (fosfataza alcalină şi γ-glutamil-transferaza) prezintă o tendință la creştere.

Intervențiile chirurgicale pe cord se însoțesc, conform aşteptărilor, de o creştere în ser a enzimelor de proveniență miocardică.

12.4.2. Modificări ale enzimelor serice în bolile musculaturii

O treime din masa corporală este reprezentată de musculatură, care conține cantități importante de CK-MM, LDH_{4-5}, aldolază (ALD) şi cantități relativ mai reduse de ASAT. Ar trebui deci ca orice leziune musculară să se însoțească de creşteri marcate ale acestor enzime în ser.

Gradul de modificare a activității serice a enzimelor menționate depinde însă în mare măsură de activitatea musculaturii şi implicit de fluxul sanguin capabil să antreneze în torentul circulator enzimele scurse din musculatura lezată. Aşa se explică faptul că, după contuzii sau chiar după intervenții chirurgicale, care produc leziuni limitate ale musculaturii, creşterile activităților serice ale CK şi LDH nu sunt deosebit de accentuate, musculatura lezată fiind pusă în repaus şi având o circulație sanguină restrânsă.

Pe de altă parte, efortul fizic intens, care antrenează o creştere importantă a fluxului sanguin în musculatură, poate duce la creşteri semnificative ale CK (izoenzima CK-MM), cauzate probabil de o hipoxie trecătoare. De atfel, aşa cum s-a arătat anterior, hipoxia severă şi generalizată a musculaturii, survenită în stările de şoc, se însoțeşte de creşteri importante ale enzimelor provenite din musculatură. Creşteri ale CKMM de peste 10 ori limita superioară a normalului se întâlnesc în sindromul de strivire (*crush syndrome*).

Creşteri moderate, dar semnificative ale CK-MM se pot decela şi după injecții intramusculare cu tetraciclină, penicilină, diazepam şi antiaritmice, fapt care atrage atenția asupra importantei naturii chimice a substantei injectate. De altfel leziunile toxice ale musculaturii între care şi o intoxicație acută cu alcool, pot duce în unele cazuri la o aşa zisă **rabdomioliză** şi la creşteri extrem de accentuate ale CK (izoenzima CKMM).

Distrofiile musculare reprezintă însă principalul domeniu în care determinările de enzime îşi găsesc valoare diagnostică. De fapt, creşteri extrem de accentuate ale CK (izoenzima CKMM) care pot depăşi de 10-30 de ori limita superioară a normalului se întâlnesc în distrofia musculară progresivă, mai ales în tipul Duchenne.

Modificările survenite în tipul rizomelic, tipul facio-scapulo-umeral, distrofia miotonică şi în bolile neuromusculare sunt mai puțin exprimate. Important este faptul că cele mai importante creşteri ale CK se constată în fazele de debut ale unei distrofii musculare progresive, când manifestările clinice locomotorii sunt relativ mai puțin exprimate, iar pierderile de masă musculară sunt încă relativ reduse. Pe măsură însă ce boala progresează şi musculatura este înlocuită cu țesut conjunctiv şi grăsos, activitatea CK scade, astfel încât la bolnavii imobilizați activitatea enzimelor serice ajunge adeseori la valori în limite normale.

Dacă, pe lângă creşterea izoenzimei CKMM se constată şi valori crescute ale inzoenzimei CKMB se poate bănui că procesul distrofic interesează şi miocardul.

Determinările de CK şi ALD pot fi utile şi pentru stabilirea mecanismului genetic de transmitere a acestei anomalii cu caracter familial, care se transmite prin gena patologică legată de cromozomul X şi care dă manifestări clinice doar la subiecții de sex masculin născuți din mame care prezintă o alelă mutantă. De fapt femeile purtătoare ale alelei mutante şi care transmit anomalia, prezintă, de re-

gulă, nivele serice de CK şi ALD situate deasupra limitei superioare a normalului.

Dermatomiozitele se însoţesc şi ele de creşteri evidente ale CK, LDH şi ALD, mai ales în cursul puseelor acute, iar tratamentul cu cortizon normalizează nivelul seric al acestor enzime, rămânând însă fără efect în cazurile de distrofie musculară progresivă.

Hipertermia malignă este o formă particulară de miopatie, care survine în cursul anesteziilor (un caz la 20.000-50.000 anestezii) şi care se însoţeşte de o creştere masivă a CK, ASAT şi LDH.

Cei mai cunoscuţi agenţi declanşatori sunt halotanul şi succinilcolina, dar au fost incriminate şi eterul, tricloretilena, ciclopropanul, xilina, diazepamul şi chiar barbituricele. Se consideră că astfel de agenţi anestezici şi miorelaxanţi depolarizanţi ar declanşa la anumiţi subiecţi cu o susceptibilitate particulară un flux rapid de calciu din depozitele intracelulare spre mioplasmă. Ca urmare, se produce o excesivă exacerbare a oxidărilor, evoluând cu decuplarea fosforilărilor oxidative şi acidoză. Aceste fenomene sunt în măsură să explice atât leziunile fibrelor musculare şi implicit creşterea în ser a enzimelor amintite mai sus cât şi febra instalată brusc.

De fapt, la scurt timp de la administrarea unuia din agenţii mai sus amintiţi, subiectul susceptibil dezvoltă subit tahicardie, tahipnee, rigiditate musculară (debutată de regulă ca trismus), şi o creştere extrem de accentuată a temperaturii (uneori 41°C-42°C). Determinările de CK, AST şi LDH vin să confirme diagnosticul. Această "explozie metabolică" prezintă o deosebită gravitate (deces în aproximativ 60% din cazuri) de unde şi denumirea de hipertermie malignă.

12.4.2.1. Alţi parametri de laborator utilizaţi în diagnosticul bolilor miocardului şi ale musculaturii striate

Pe lângă determinările enzimelor şi izoenzimelor mai sus amintite, diagnosticul şi monitorizarea leziunilor miocardului şi ale musculaturii striate mai beneficiază de pe urma dozărilor imunochimice ale unor proteine specifice acestor ţesuturi şi trecute în ser. Aşa de exemplu, orice leziune acută a ţesuturilor musculare şi a miocardului duce la eliberarea de **mioglobină**, care având o greutate moleculară relativ redusă (în jur de 17 kDa) se elimină prin urină şi poate fi detectată şi în acest produs de excreţie.

O importanţă mai mare se acordă dozărilor serice de **troponina T** (TnT). Această proteină din structura musculaturii striate şi din miocard contribuie împreună cu actina şi tropomiozina la formarea miofibrilelor. Metode imunochimice bazate pe utilizarea anticorpilor monoclonali au reuşit să identifice şi să dozeze diferenţiat o troponină T de origine musculară şi o TnT specifică miocardului. Se consideră că determinările de TnT miocardică ar fi mai specifice pentru leziunile miocardului decât dozările de enzime, că TnT ar creşte mai rapid decât CK şi că această creştere ar fi mai persistentă chiar decât creşterea activităţii LDH (v. şi *Capitolul 23*).

Durata unei dozări de TnT printr-un procedeu ELISA este însă de 90 minute, în timp ce determinarea activităţii CK nu depăşeşte 7 minute. Acest neajuns, ca şi costul ridicat a reactivilor pentru dozarea TnT miocardice (care necesită anticorpi monoclonali) restrâng utilizarea acestei dozări imunochimice doar pentru situaţii particulare (lezări concomitente ale musculaturii şi miocardului, diagnosticul retrospectiv al infarctului).

12.4.3. Rolul dozărilor de enzime serice în hematologia clinică şi oncologie

Anemiile megaloblastice constituie un exemplu tipic despre utilitatea determinărilor de enzime serice pentru stabilirea diagnosticului şi evaluarea eficacităţii terapiei în hematologia clinică. De fapt, în astfel de cazuri creşterile activităţii serice a LDH (în special izoenzima LDH_1) depăşesc de 4-20 ori limita superioară a normalului, iar tratamentul cu vitamina B_{12} duce la normalizarea acestei activităţi în decurs de 10-14 zile. De notat că tendinţa de revenire spre normal a activităţii serice a LDH începe şi devine evidentă înainte de apariţia crizei reticulocitare (*Figura 12.15*). Merită semnalate observaţiile conform cărora activitatea serică a LDH este întotdeauna crescută în anemiile megaloblastice cu nivel sanguin scăzut de vitamina B_{12} şi/sau acid folic şi cu răspuns favorabil la terapia substitutivă, în timp ce, în anemiile cu aspect megaloblastic al măduvei, dar refractare la tratamentul cu vitamina B_{12} sau cu acid folic, activitatea LDH nu este modificată în ser.

Astfel de cazuri de "anemie megaloblastică refractară" publicate de Simon şi colab. în 1978 ar putea fi doar aspecte particulare ale sindromului mielodisplazic. De fapt, în toate cazurile de sindrom mielodisplazic urmărite în laboratorul nostru, activitatea serică a LDH nu a depăşit limita superioară a normalului.

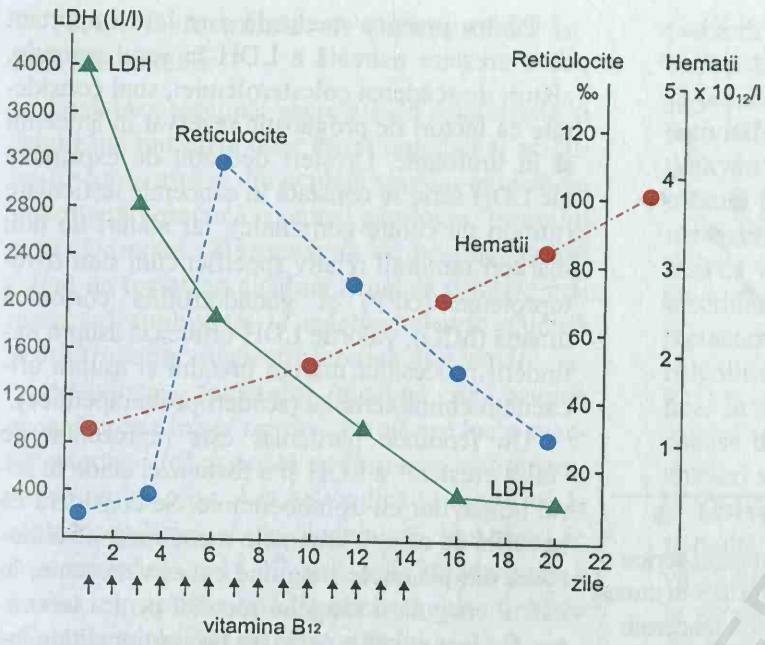


Figura 12.15. Exemplu ilustrativ privind comportarea LDH1 a reticulocitelor şi a numărului de hematii în cursul tratamentului cu vitamina B12 a unui bolnav cu anemie megaloblastică şi răspuns postterapeutic adecvat. De notat scăderea promptă a LDH încă din primele zile de tratament substitutiv.

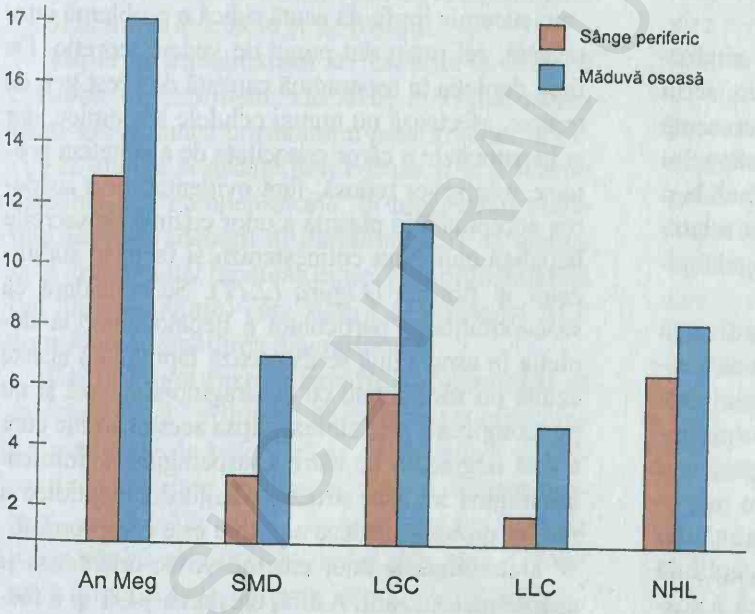


Figura 12.16. Comportarea activității LDH în serul sângelui recoltat din vena cubitală (coloane albe) şi în serul sângelui medular (coloane haşurate) la bolnavi cu anemie megaloblastică (An.Meg.) la bolnavi cu sindrom mielodisplazic (SMD) în leucemia granulocitară cronică (LGC), leucemie limfoidă cronică (LLC) şi la bolnavi cu limfom non Hodgkin (NHL). Pe ordonată - activitatea în multipli ai limitei superioare a normalului din serul sângelui periferic. Coloanele reprezintă mediana valorilor obținute.

Valori normale ale activității serice a LDH s-au găsit în anemiile feriprive, anemiile sideroblastice, în cazurile de aplazie medulară şi în majoritatea cazurilor de anemie hemolitică cu evoluție cronică.

De notat totuşi că în anemiile hemolitice creşteri ale LDH_1 şi LDH_2 pot surveni în cursul crizelor de deglobulizare acută, dar chiar şi în astfel de cazuri activitatea serică a LDH se situează sub media valorilor întâlnite în anemiile megaloblastice. Dacă însă, la un bolnav cu anemie hemolitică, se constată o creştere importantă şi persistentă a activității serice a LDH, se poate bănui că a intervenit o carență secundară de acid folic. O astfel de carență poate surveni ca urmare a unei exacerbări cu caracter compensator a eritropoiezei şi implicit consumului excesiv a rezervelor de acid folic de către eritronul hiperplaziat (mai ales când acest consum exagerat nu este corectat de un aport adecvat). Întrucât în situația mai sus menționată elementele seriei roşii capătă un caracter macrocitar sau chiar megaloblastic, mecanismul creşterii activității serice a LDH este mai probabil similar cu cel care intervine în anemiile de tip Biermer.

Deşi acest mecanism nu este încă pe deplin elucidat, se consideră că o degradare intramedulară a elementelor imature ale eritronului şi un turnover accelerat al acestor celule s-ar solda cu o eliberare masivă de LDH care trece în sângele circulant.

Pentru un astfel de concept pledează şi observațiile care au evidențiat valori de 2-3 ori mai ridicate ale activității LDH în serul sângelui medular al bolnavilor cu anemie megaloblastică, comparativ cu activitatea acestei enzime în serul obținut din sângele recoltat din vena cubitală, la aceiaşi bolnavi. Pe de altă parte, activitatea LDH este relativ mult redusă atât în serul sângelui medular cât şi în serul sângelui periferic al bolnavilor cu leucemie limfoidă cronică, o stare patologică în care nu survine o proliferare a ele-

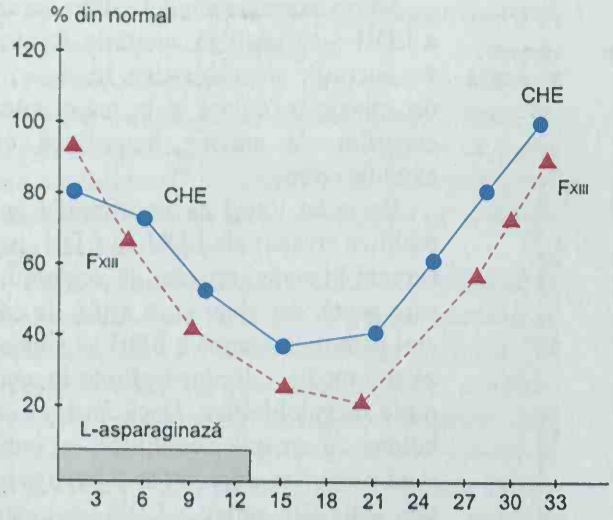


Figura 12.17. Comportarea colinesterazei serice (CHE) şi a factorului XIII stabilizator al fibrinei în cursul terapiei cu L-asparaginază la un bolnav cu leucemie limfoblastică.

Pe abscisă - timpul în zile, pe ordonată - activitatea enzimelor în procente din media valorilor normale. De notat scăderea paralelă a activităților CHE şi a factorului XIII în urma acestei terapii care perturbă sinteza hepatică de proteine. La oprirea terapiei activitățile CHE şi a factorului XIII tind să revină la normal.

mentelor mieloide. De notat însă, că în sindromul mielodisplazic, activitatea LDH din serul sângelui medular este disproporționat crescută față de valorile normale găsite în serul sângelui periferic al acestor bolnavi, ceea ce pretează la o analogie cu discordanța între celularitatea relativ bogată a măduvei şi pancitopenia din sângele periferic (*Figura 12.16).*

În ciuda dificultăților privind standardizarea probelor de sânge medular, apare evident că activitatea fosfatazei alcaline din serul sângelui medular este mult crescută față de cea din serul sângelui periferic, acest fenomen fiind mai pregnant în stările patologice carcaterizate printr-o măduvă osoasă proliferată. Deşi fosfataza alcalină din măduva osoasă s-a dovedit a fi mai susceptibilă la inactivare prin căldură, o caracteristică a fosfatazei alcaline de origine osoasă, nu se poate afirma cu certitudine la ora actuală, dacă activitatea crescută a fosfatazei alcaline, în serul sanguin al unei măduve proliferate, reprezintă o expresie a remodelării osteoblastice a traveelor osoase, consecutivă proliferării elementelor mieloide, sau este doar o consecință a eliberării nespecifice a acestei enzime din celulele hematopoietice sau stromale ale măduvei.

Pentru practica medicală este însă important că o creştere marcată a LDH în serul sanguin, alături de scăderea colesterolemiei, sunt considerate ca factori de prognostic rezervat în leucemii şi în limfoame. Creşteri deosebit de exprimate ale LDH seric se constată în cancerele testiculare (tumori cu celule germinale), iar alături de unii markeri tumorali relativ specifici cum sunt α-fetoproteina (αFP) şi gonadotrofina corionică umană (hCG), valorile LDH orientează asupra extinderii procesului malign precum şi asupra eficacității chimioterapiei (scăderi postterapeutice).

Un fenomen particular este reprezentat de "falsa creştere" a LDH şi a fosfatazei acide în serul bolnavilor cu trombocitemie. Se consideră că în astfel de cazuri, enzimele menționate se eliberează din plăcuțele sanguine excesiv crescute, în cursul coagulării sângelui recoltat pentru laborator. De fapt există o oarecare proporționalitate între numărul de plăcuțe din sânge şi activitatea LDH a serului. Degradarea plăcuțelor sanguine aflate în exces la bolnavii cu trombocitemie explică şi creşterea concentrației de potasiu în serul dar nu şi în plasma acestor bolnavi.

Tratamentul cu L-asparaginază al bolnavilor cu leucemie limfoidă acută ridică o problemă interesantă, cel puțin din punct de vedere teoretic. De fapt, depleția în asparagină cauzată de acest gen de terapie, afectează nu numai celulele leucemice, dar şi hepatocitele a căror capacitate de a sintetiza proteine este sever redusă, fapt evidențiat prin scăderea accentuată în plasma a unor enzime de secreție hepatică cum sunt colinesteraza şi factorul stabilizator al fibrinei (*Figura 12.17*). Se consideră că susceptibilitatea particulară a hepatocitelor la depleția în asparagină se datorează faptului că aceste celule nu sunt dotate cu asparagino-sintetază şi nu pot compensa, prin sinteză, lipsa acestei amide care a fost degradată de către L-asparaginază. Întrucât asparagina intră în structura lanțurilor peptidice a multor proteine, sinteza acestora este compromisă.

Determinările unor enzime serice orientează şi asupra metastazării. Astfel, creşterea γ-GT şi a fosfatazei alcaline sugerează apariția unor metastaze hepatice , iar o creştere izolată a fosfatazei alcaline (izoenzima termolabilă) pledează pentru metastaze osoase ale anumitor tumori osteogene. S-au semnalat creşteri ale activităților unor enzime ca sialiltransferaza, galactoziltransferaza II şi fucozil-transferaza în serul (sau plasma) bolnavilor cu diverse forme extinse de cancer, dar aceste examinări nu şi-au găsit locul în practica de uz curent.

12.4.4. Determinări de enzime serice în boli ale oaselor

Fosfataza alcalină, secretată de osteoblaste şi catalizând hidroliza unor esteri organici ai acidului fosforic, este la ora actuală singura enzimă cu importanță practică pentru patologia țesutului osos. De notat că izoenzima de origine osoasă diferă de fosfataza alcalină hepatică printr-o mai mare susceptibilitate la inactivarea prin căldură şi printr-o migrare electroforetică mai lentă.

Activitatea fosfatazei alcaline de origine osoasă creşte în ser ori de câte ori are loc o reacție osteoblastică asociată cu formarea sau repararea țesutului osos. Aşa se explică şi faptul că la vârsta copilăriei şi, în general în perioada de creştere (până la 15-17 ani) activitatea serică a fosfatazei alcaline (ALP) prezintă valori duble sau chiar triple față de cele intâlnite la adulți.

Rahitismul evoluează cu creşteri importante ale fosfatazei alcaline serice, iar tratamentul adecvat cu vitamina D reduce activitatea enzimei la valori normale corespunzătoare vârstei. Se consideră că această creştere a ALP este o consecință a reacției osteoblastice ineficiente, din cauza deficitului de calciu şi de fosfați.

Hiperparatiroidismul se însoțeşte de creşteri deosebit de exprimate ale ALP, mai ales atunci când sub acțiunea hormonului paratiroidian în exces se ajunge la decalcifieri osoase şi la o reacție osteoblastică compensatorie. În hiperparatiroidismul primar (adenom al paratiroidelor) se ajunge la o importantă hipercalcemie şi hipofosfatemie (cu hiperfosfaturie) care alături de creşterea ALP contribuie la stabilirea diagnosticului

Boala Paget (osteodistrofia deformantă) se caracterizează printr-un oarecare paralelism între procesele de osteoliză şi osteogeneză şi respectiv o alternare pe diverse zone a acestor procese, astfel încât calciul resorbit dintr-o zonă de liză a osului este utilizat într-o altă zonă. Ca urmare modificările suferite de calciul şi fosfatul seric sunt nesemnificative, iar valorile mult crescute ale AlP sunt de o reală utilitate în diagnosticul de laborator al acestei afecțiuni osoase.

Procesele tumorale primare sau secundare ale scheletului se însoțesc de creşteri ale ALP, în măsura în care dau naştere la o reacție osteoblastică. Aşa de exemplu, tumorile primare osteogene evoluează cu valori ridicate ale activității serice a ALP, în timp ce în sarcoamele osteolitice (sarcom Ewing, reticulosarcoame ale oaselor) activitatea enzimei se situează în limite normale.

Reacții osteoblastice şi implicit creşteri ale activității ALP se constată în metastazele pornite dintr-un carcinom de prostată şi doar în mai mică măsură în caz de metastaze pornite din carcinoame mamare sau alte procese tumorale. De notat însă că valori normale ale ALP la un bolnav cu o afecțiune neoplazica nu pot exclude prezența metastazelor osoase care pot evolua uneori doar osteolitic, nefiind însoțite de o reacție osteoblastică. În acest sens este de menționat că leziunile osoase din mielomul multiplu nu se însoțesc de creşteri ale activității ALP în ser.

Osteoporoza constituie la ora actuală o importantă problemă de sănătate cauzatoare de invaliditate. Afecțiunea care afectează persoanele în vârstă avansată şi în special femeile după vârsta menopauzei se traduce prin pierderea progresivă şi lentă de țesut osos. Din păcate laboratorul contribuie încă în mică măsură la diagnosticul osteoporozei, iar valorile fosfatazei alcaline nu sunt semificativ modificate.

Scăderi ale activității fosfatazei alcaline au fost semnalate în afecțiuni evoluând cu o încetinire a osificării şi neînsoțite de reacții osteoblastice, ca de exemplu în deficitul sever de vitamină C, hipotiroidism sever instalat încă din copilărie, precum şi în caz de inhibare a enzimei ca urmare a perfuziilor cu EDTA administrate în scop terapeutic la subiecții intoxicați cu plumb. Cele mai importante scăderi ale ALP de origine osoasă se întâlnesc însă în hipofosfatazie, o afecțiune genetică evoluând cu fenomene de rahitism rezistent la terapia cu vitamina D.

Atunci când contextul clinic nu permite o orientare asupra provenienței ALP serice şi când nu sunt condiții pentru diferențierea izoenzimei osoase față de cea hepatică se recomandă explorarea activității serice a γ-glutamil-transferazei (γGT). Astfel, creşterile concomitente ale ALP şi γGT atrag atenția spre o origine hepatică a ALP în cadrul unei colestaze, pe când o creştere izolată a ALP poate sugera izoenzima de proveniență osoasă.

12.4.5. Dozările de fosfatază acidă şi carcinomul prostatei

Investigarea activității serice a fosfatazei acide (AcP) este indicată în suspiciunea de carcinom al prostatei. Din păcate creşteri evidente ale acestei enzime survin doar în stadiile relativ

avansate, atunci când tumora a depăşit capsula şi mai ales atunci când a produs metastaze osoase. Ca urmare, o creştere concomitentă şi exprimată a ALP şi AcP sugerează metastaze osoase ale carcinomului de prostată şi poate diferenția o astfel de situație de alte afecțiuni ale osului. De notat că o creştere moderată, uneori abia schițată, a activității serice a AcP poate surveni şi în unele boli osoase cum sunt osteopetroza (boala Albers-Schönberg), afectarea osului în boala Gaucher şi în unele cazuri de metastaze osoase ale unui cancer mamar, iar "creşteri false" ale AcP în ser se pot constata în trombocitemii. Originea prostatică a fosfatazei acide poate fi detectată pe baza proprietății izoenzimei prostatice de a fi rapid inhibată de tartrat (izoenzima prostatică tartrat inhibabilă). Astfel, activitatea AcP prostatică = activitatea AcP - activitatea AcP + tartrat.

Determinările de fosfatază acidă şi-au pierdut însă mult din valoarea lor diagnostică, de când se poate practica dozarea imunochimică (ELISA) a aşa-zisului antigen specific al prostatei (*prostatic specific antigen*, PSA) care creşte mai precoce şi mai evident în caz de carcinom al prostatei decât fosfataza acidă.

12.4.6. Dozări de enzime în bolile pancreasului

Suferințele acute sau cronice ale pancreasului survin de cele mai multe ori în asociere cu alte îmbolnăviri, între care pe primul plan se situează litiaza biliară şi alcoolismul. Hipertrigliceridemiile severe (*v. Capitolul 8*) predispun şi ele la dezvoltarea leziunilor pancreasului. Din acest motiv, este important de a se face o diferențiere între testele de laborator consecutive leziunilor pancreatice şi cele cauzate de suferința altor organe, survenite concomitent şi în strânsă legătură cu afectarea pancreasului. Astfel, deşi țesutul pancreatic este bogat în γGT, creşterea activității serice a acestei enzime, la un bolnav cu pancreatită acută, poate fi mai degrabă considerată ca fiind expresia unei suferințe hepato-biliare şi a alcoolismului. Hepatopatia cu caracter colestatic poate explica şi nivelele crescute ale ALP, ASAT şi ALAT care cresc în cadrul unei colici biliare precedând sau evoluând concomitent cu o pancreatită acută. Creşterea concentrației serice a acizilor biliari în numeroase astfel de cazuri constituie de altfel o dovadă a intervenției unui reflux biliar. Pe de altă parte, o creştere a LDH (izoenzimele LDH_4 şi LDH_5) şi a CK (izoenzima CKMM), survenită la un bolnav cu o formă deosebit de severă de pancreatită acută, se explică în cadrul stării de şoc şi respectiv a hipoxiei musculaturii.

Principalele enzime, a căror creştere poate fi pusă în legătură directă cu lezarea pancreasului şi care sunt utilizate în mod curent în scop de diagnostic sunt alfa-amilaza şi lipaza. Aceste enzime trec în ser ca urmare a unei alterări a partiției exo-endocrine, dar interpretarea variațiilor suferite de activitatea lor implică o serie de dificultăți care sunt analizate în cele de urmează.

12.4.6.1. Pancreatita acută

Formele severe ale acestei boli sunt o consecință a autodigestiei țesutului pancreatic şi a necrozei consecutive a parenchimului. Există însă şi numeroase cazuri în care leziunile nu ajung până la forme necrotice-hemoragice şi se limitează la modificări de membrană şi la edem.

Atât în formele grave cât şi în cele mai atenuate se constată o creştere a activității α-amilazei serice care, la 4-5 ore de la debutul durerilor abdominale, poate ajunge la valori de 5 ori superioare celor normale, iar în decurs de 24 ore poate depăşi de 10 ori limita superioară a normalului. Gradul de creştere al α-amilazei este însă variabil de la caz la caz şi nu s-a putut stabili o legătură certă între gradul acestei creşteri şi gravitatea fenomenelor clinice sau evoluția ulterioară a bolii.

Datorită eliminărilor urinare ale α-amilazei, valorile anormal crescute ale acestei enzime tind să revină spre normal deja din ziua a doua de la debutul fenomenelor acute şi doar in rare cazuri persistă mai mult de 72 de ore. Ca urmare, determinarea activității α-amilazei în urina colectată pe o perioadă de 24 de ore poate detecta retrospectiv eliberări ale enzimei din acinii pancreasului.

Valorile amilazuriei trebuie însă întotdeauna raportate la volumul pe 24 de ore al urinei. De notat că în cazurile evoluând cu stare de şoc şi oligurie eliminările urinare de α-amilază se reduc, iar creşteera activității enzimei în ser persistă mai mult de 72 ore.

Valoarea diagnostică a determinărilor de α-amilază este limitată şi datorită faptului că activitatea serică a acestei enzime depinde nu numai de izoenzima pancreatică, dar şi de cea provenită din glandele salivare, iar parotiditele se însoțesc de creşteri importante ale amilazei serice. Există însă posibilitatea de a diferenția cele două izoenzime prin separări electroforetice, prin rezistența la diverşi inhibitori şi prin adsorbția pe schimbători de ioni.

Tabelul 12.V. Cauze extrapancreatice ale creşterii activităților serice ale amilazei şi lipazei.

	α-amilaza	Lipaza
Ulcer perforat*	+	+
Ileus*	+	+
Infarct mezenteric*	+	+
Colecistită*	+	+
Parotidită acută**	+	-
Insuficiență renală	+	-
Macroamilazemie	+	-
Sarcină extrauterină	+	-
Sindrom paraneoplazic	+	-

+ = activitate crescută; - = activitate normală;
* = afectarea pancreasului nu poate fi exclusă;
** = asocierea unei pancreatite secundare duce şi la creşterea lipazei.

Alte stări patologice care pot duce la creşteri ale α-amilazei serice sunt ulcerul duodenal penetrant în pancreas, ocluziile intestinale, infarctul mezenteric, colecistita acută precum şi administrările de opiacee, care adeseori produc un spasm tranzitoriu al sfincterului Oddi. O suferință pancreatică cu caracter trecător nu poate fi însă exclusă în situațiile mai sus menționate.

Pe de altă parte, perturbări în procesul de eliminare pe cale urinară a a-amilazei se însoțesc de creşteri ale activității enzimei în ser, fenomen constatat în boli renale, evoluând cu reducerea filtrării glomerulare. O situație particulară este reprezentată de aşa-zisa macroamilazemie când, în urma formării unor complexe cu greutate moleculară ridicată formate de enzimă cu imunoglobulinele (mai ales IgA), se previne filtrarea glomerulară a acestor complexe şi implicit a α-amilazei a cărei activitate creşte în ser. Acest fenomen nu pare a avea însă consecințe patologice şi este lipsit de semnificație clinică.

Surprinzătoare sunt însă creşterile activității serice ale α-amilazei în sarcina extrauterină, tumori ovariene, salpingite, precum şi în sindromul paraneoplazic întovărăşind, de exemplu, unele carcinoame bronşiale. Mecanismele care duc la astfel de creşteri nu sunt încă pe deplin elucidate, incriminându-se în unele cazuri prezența de țesut pancreatic ectopic.

Determinările de lipază serică, o enzimă considerată a fi mai specifică țesuturilor pancreatice şi care persistă mai mult timp in ser, nu înlătură decât în parte inconvenientele determinărilor de α-amilază (*Tabelul 12.V*).

În schimb, dozările de tripsinogen prin metode radioimunologice sau prin ELISA sunt considerate a fi deosebit de specifice, acest zimogen fiind produs doar de acinii pancreatici.

Observațiile clinice seriate au relevat că în cazurile în care factorii de risc ai pancreatitei acute (de exemplu litiaza biliară, alcoolismul, hipetrigliceridemiile excesive) persistă, atacurile de pancreatită pot căpăta un caracter recurențial, iar suferința pancreatică trece spre o formă cronică.

12.4.6.2. Pancreatita cronică

Cea mai mare parte a bolnavilor de pancreatită cronică sunt alcoolici, iar în cazuri mai rare se pot incrimina alți factori toxici sau hepatopatiile colestatice evoluând cu cresteri ale nivelului plasmatic de acizi biliari. Boala are un caracter lent progresiv şi ajunge cu timpul la insuficiență pancreatică. Diagnosticul pancreatitei cronice întâmpină însă dificultăți deoarece manifestările clinice sunt necaracteristice, iar creşterile activității α-amilazei din ser sau din urină survin doar în cursul eventualelor atacuri recurente, fiind de altfel din ce în ce mai puțin exprimate pe măsură ce parenchimul pancreatic este înlocuit de țesut scleros.

Avându-se în vedere că pancreasul sintetizează zilnic câteva grame de enzime pe care le secretă în duoden, este firesc ca o insuficiență a acestui organ să ducă la scăderea α-amilazei şi a lipazei în sucul duodenal. Datorită însă partiției exo-endocrine mai sus amintite, ar fi de aşteptat ca activitatea acestor enzime să scadă şi în ser. În realitate, scăderea activității serice a α-amilazei în cazurile de insuficiență pancreatică este puțin exprimată. Nu trebuie uitat că, în lipsa unui proces acut de pancreatită, mai bine de două treimi din activitatea α-amilazei serice este dată de izoenzima salivară, astfel încât o eventuală scădere a componentei pancreatice are efect minor asupra activității enzimatice globale din ser. Dozările selective ale izoenzimei pancreatice, determinările de lipază serică sau dozarea radioimunologică a tripsinogenului ar putea detecta însă şi stările de hipoenzimie cauzate de reducerea parenchimului pancreatic.

De fapt, insuficiența secretorie a pancreasului poate fi mai obiectiv evaluată prin dozarea enzimelor secretate în sucul duodenal pe unitatea de timp în urma stimulării maximale cu secretină-pancreozimină, sau prin dozări de chimotripsină în materiile fecale.

În scopul evitării intubării duodenului, s-a imaginat un test bazat pe administrarea orală a unui peptid sintetic (acid N-benzoil-L-tirozil-p-aminobenzoic). Acest peptid este clivat de chimotripsină în sucul duodenal, eliberând acid p-aminobenzoic (PABA) care se absoarbe din intestin în circulație, și se elimină prin urină unde poate fi dozat. La bolnavii cu insuficiență pancreatică recuperarea în urină a PABA este de aproximativ 50% față de normali. Acest test este însă influențat de eventuale perturbări renale, intestinale sau hepatice.

Insuficiența pancreatică poate fi cauzată nu numai de o pancreatită dar și de alte procese patologice, ca de exemplu, fibroza chistică a pancreasului, carența severă de proteine (Kwashiokor), hemocromatoza, carcinoame ale pancreasului sau ale regiunii ampulare, precum și deficite cu caracter genetic afectând sinteza diferitelor enzime pancreatice.

12.4.6.3. Enzimele serice în carcinomul pancreasului

Atunci când carcinomul interesează capul pancreasului și obstruează ductul biliar principal determinând astfel o colestază extrahepatică, sau în caz de metastaze hepatice ale unui astfel de carcinom se ajunge la creșterea enzimelor indicatoare ale colestazei, ca de exemplu ALP și γGT, această creștere accentuându-se progresiv în cursul evoluției. Activitatea serică a enzimelor provenite din pancreas, respectiv α-amilaza și lipaza nu se modifică însă în mod semnificativ în carcinoamele pancreasului, chiar și atunci când neoplasmul duce la obstrucția ductului pancreatic.

Astfel de rezultate negative privind comportarea α-amilazei și lipazei se datoresc probabil caracterului lent și progresiv cu care se instalează obstrucția și mai ales atrofiei țesutului pancreatic.

12.4.7. Enzimele serice în bolile ficatului

Dozările de enzime serice își găsesc o largă aplicabilitate în bolile ficatului. În esență, astfel de determinări pot oferi informații cu privire la următoarele aspecte ale patologiei hepatice:

1. Detectarea unei creșteri patologice a permeabilității membranei hepatocitului (de ex. ASAT, ALAT, GLDH, LDH_{4-5}).
2. Depistarea unei insuficiențe a sintezei de proteine în hepatocite (de ex. colinesteraza serică și enzime cu rol în coagularea sângelui).
3. Indicii cu privire la existența unui proces de colestază (de ex. ALP și γGT).
4. Indicii cu privire la o eventuală inducere de enzime (ca exemplu tipic γGT).

Dozările de enzime serice își găsesc o largă aplicabilitate în bolile ficatului. În esență, astfel de determinări pot oferi informații cu privire la următoarele aspecte ale patologiei hepatice:

1. detectarea unei creșteri patologice a permeabilității membranei hepatocitului, (de ex.: ASAT, ALAT, GLDH, LDH_{4-5});
2. depistarea unei insuficiențe a sintezei de proteine în hepatocite (de ex. colinesteraza serică și enzime cu rol în coagularea sângelui);
3. indicii cu privire la existența unui proces de colestază (de ex. ALP și γGT);
4. indicii cu privire la o eventuală inducere de enzime (ca exemplu tipic, γGT).

Asupra acestor aspecte se va reveni detaliat în *Capitolul 21.*

12.4.8. Anomalii enzimatice cu repercusiuni asupra activităților neuropsihice

Sinteza neurotransmițătorilor și a mielinei, precum și menținerea proceselor neuropsihice consumatoare de energie se bazează pe procese metabolice catalizate de către enzime.

Pe de altă parte, explorarea activităților enzimatice din creier întâmpină reale dificultăți. Bariera hematoencefalică limitează trecerea în circulație a diferitelor enzime și proteine provenite din neuroni, chiar și atunci când neuronii sunt lezați, iar efectuarea unor biopsii din creier nu intră în discuție. Evaluări aproximative și indirecte ale unor eventuale anomalii enzimatice în sistemul nervos central s-au făcut prin examinări biochimice postmortem și prin observții referitoare la scăderea concentrației în LCR a produșilor de reacție care ar fi trebuit să rezulte din activitatea unei anumite enzime (de exemplu, scăderea dopaminei și noradrenalinei în deficitul de tirozin-hidroxilază, sau scăderea serotoninei și mai ales a produsului său de degradare 5 HIAA în deficitul de triptofan 5 hidroxilază).

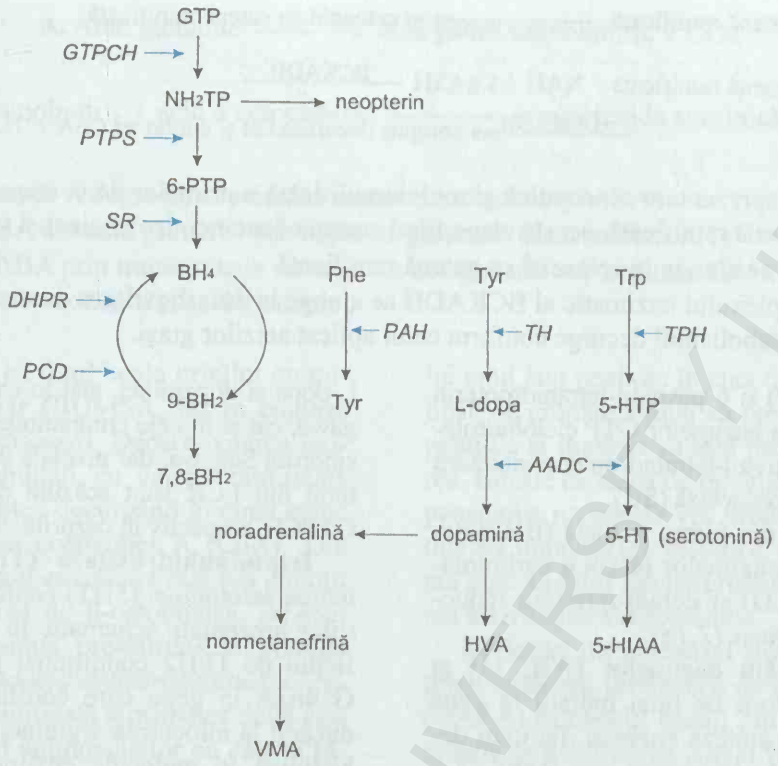


Figura 12.18. Reprezentare schematică şi sintetică a mecanismului de sinteză a 5, 6, 7, 8 tetrahidrobiopterinei (BH4) şi a rolului său de cofactor în activitatea enzimelor PAH, TH şi TPH2.
AADC – decarboxilaza acizilor aminați; HVA-acid homovanilic; VMA - acid vanilmandelic; 5HIAA - acid 5 hidroxiindolacetic

Un progres substanțial s-a obținut prin metodele biologiei moleculare, când după descifrarea genomului uman s-au putut detecta mutații în genele unor anumite enzime, făcându-se apoi corelații cu manifestările clinice şi de laborator accesibile laboratorului.

Mult mai facilă apare investigarea atunci când o enzimă se exprimă în organe accesibile explorării bioptice, iar deficitul metabolic se repercută asupra funcțiilor neuropsihice.

Nu este deci întâmplător că stabilirea legăturii între o anomalie enzimatică şi retardarea dezvoltării intelectuale s-a stabilit în cazul hiperfenilalaninemiei (fenilcetonuria, PKU), o boală cauzată de un deficit al enzimei fenil-alanin-hidroxilază (PAH) din ficat (accesibil biopsiei), iar perturbarea metabolică, respectiv excesul de fenilalalnină din circulație afectează dezvoltarea psihică, în timp ce un regim sărac în acest aminoacid atenuează efectele negtive ale deficitului enzimatic. De notat că în aceste anomalii, deficitul poate fi detectat relativ uşor şi precoce prin teste screening cum este testul Guthrie [51]. S-a constatat însă că aproximativ 1-3% din cazurile de hiperfenilalaninemie nu răspund favorabil la restricția de fenilalanină din dietă, iar astfel de copii au avut o evoluție clinică mai nefavorabilă, cu progresiunea fenomenelor neurologice, manifestate prin distonie şi dificultăți la deglutiție [51].

Activitatea fenil-alanin-hidroxilazei fiind dependentă de cofactorul tetrahidrobiopterină (BH_4) s-a încercat o terapie cu acest cofactor în acele cazuri care nu beneficiau de o dietă limitată (săracă) în fenilalanină cu obținerea de rezultate favorabile în multe cazuri, prin scăderea nivelului plasmatic de fenilalanină. Ulterior s-a demonstrat că deficitul de BH_4 se repercută nefavorabil şi asupra activității altor enzime cu acțiune asupra aminoacizilor aromatici, aşa cum sunt tirozinhidroxilaza (TH) şi triptofanhidroxilaza 2 (TPH2 izoenzima neuron-specifică), ambele aceste enzime exercitându-şi acțiunea în creier [16, 22].

Relația între sinteza şi metabolismul BH_4 şi activitatea enzimelor PAH, TH şi TPH este ilustrată în *Figura 12.18*, preluată după Hyland cu mici modificări [22].

Biosinteza BH4 porneşte de la guanozin-trifosfat (GTP), trecând prin stadiile de dihidro-neopte-

A. aminoacid cu catenă ramificată ⟶ α cetoacid cu catenă ramificată

B. α cetoacid cu catenă ramificată + NAD + CoASH $\xrightarrow{BCKADH}$

$\xrightarrow{BCKADH}$ compus decarboxilat și cuplat cu CoA + NADH + H^+ + CO_2

Figura 12.19. Reprezentare schematică și mult simplificată a primelor două etape din metabolismul aminoacizilor cu catenă ramificată, aceste etape fiind comune leucinei, izoleucinei și valinei:
- prin transaminare se ajunge la cetoacizi cu catenă ramificată
- sub acțiunea complexului enzimatic al BCKADH se ajunge la decarboxilarea acestor cetoacizi

În continuare, catabolismul decurge conform celui aplicat acizilor grași.

rin-trifosfat (NH2TP) și 6 piruvoil-tetrahidropterin (6 PTP) sub acțiunea enzimelor GTP ciclohidrolază (GTPCH), 6 piruvoil-tetrahidropterin-sintetază (PTPS), sepiapterin-reductază (SR).

Reciclarea BH4 din forma oxidată (BH2) decurge sub acțiunea enzimelor pterin α carbinolamindehidratază (PCD) și dehidropteridin reductază (DHPR) (*v. Figura 12.18*).

Scăderea activității enzimelor PAH, TH și TPH s-ar putea datora fie unei mutații în gena responsabilă pentru sinteza enzimei, fie unui deficit de cofactor BH_4. Important este faptul că o activitate insuficientă a TH se soldează cu reducerea concentrației de dopa și implicit de dopamină în nucleii striați și locus niger de pe calea motorie extrapiramidală, anomalia traducându-se pe plan clinic prin distonie evoluând cu mișcări involuntare repetitive, contorsiuni, stări posturale anormale date de contracții ale unor grupuri musculare și dificultăți la deglutiție. Toate aceste manifestări se reduc dramatic după administrarea de L-dopa.

Dacă anomaliile menționate sus de datorează deficitului de GTP-ciclohidroxilază (GTPCH), și implicit lipsei de BH_4 și insuficienței secundare a enzimei TH, această entitate nozologică constituie boala Segawa, denumită astfel după numele neurologului pediatru japonez care a descris-o încă din 1972. Boala Segawa poate fi definită ca fiind o distonie autosomal dominantă cu răspuns bun la L-dopa și cauzată de o mutație în enzima GTPCH cu rol cheie în în sinteza de BH_4 [21, 43].

S-au detectat și cazuri cu mecanism de transmitere autosomal recesiv la care manifestările de distonie la homozigoții cu mutații de tirozinhidroxilază (TH) sau în sepiapterinreductază (SR), iar pentru astfel de cazuri se utilizează termenul de sindrom Segawa spre a se sublinia diferența genetică față de boala Segawa [29, 33]. Examinările de laborator relevă o scădere a concentrației de acid homovanilic (HVA), un produs de degradare a L-dopa și dopaminei, atât în cazurile de boală Segawa, cât și în cele compatibile cu diagnosticul de sindrom Segawa, dar nivelele de neopterin și biopterin din LCR sunt scăzute doar în deficitul de GTPCH, respectiv în cazurile de boală Segawa.

Triptofanhidroxilaza (TPH2) inițiază formarea serotoninei (5HT) conform secvenței reacțiilor prezentate schematic în *Figura 12.19*. Deficitul de TPH2 condiționat genetic de mutația G1463A în gena care codifică această enzimă ducând la înlocuirea argininei din poziția 411 cu histidină în molecula enzimei, are drept efect oprirea sintezei de 5 hidroxitriptofan (5HTP), și ca urmare oprirea secreției de serotonină (5HT), neurotransmițător cu rol în prevenirea sau măcar atenuarea stărilor depresive și a tendinței la suicid [23, 58]. Aceste date obținute prin investigații bazate pe tehnici de biologie moleculară concordă cu observații mai vechi conform cărora administrarea prelungită de clorfenilalalanină, un inhibitor al TPH utilizat în terapia sindromului carcinoid se soldează cu apariția fenomenelor de depresie la pacienții astfel tratați [49].

Este însă important să se precizeze că anomaliile în neurotransmiterea serotoninergică și apariția stărilor depresive și de anxietate majoră se pot datora nu doar unui deficit de sinteză a 5HT, ci și unei depleții a acestei monoamine din veziculele de la nivelul terminațiilor sinaptice, unei recaptări accelerate din fanta sinaptică, unei degradări oxidative exagerate a 5HT sub acțiunea monoaminoxidazei (MAO), sau unor defecte cantitative sau calitative ale receptorilor postsinaptici pentru 5HT.

Deficitul decarboxilazei cetoacizilor cu catenă ramificată proveniți din dezaminarea (transaminarea) leucinei, izoleucinei și valinei se soldează cu creșterea concentrației plasmatice a acestor cetoacizi care se elimină prin urină, imprimându-i un miros particular asemănător mirosului dat de siropul de arțar [40]. De aici și nu-

A. Acid glutamic $\xrightarrow{1}$ acid gama aminobutiric + CO2

B. Acid gama aminobutiric + acid α cetoglutaric $\xrightarrow{2}$ semialdehida succinică + acid glutamic

Figura 12.20. Formarea și degradarea acidului gama aminobutiric (GABA)
- formarea GABA din acid glutamic sub acțiunea glutamat decarboxilazei (1)
- degradarea GABA prin transaminare cu acidul α cetoglutaric sub acțiunea GABA transaminazei (2), rezultând semialdehidă succinică și acid glutamic

mele dat anomaliei ca fiind boala urinilor cu miros de sirop de arțar (BUMSA, iar în engleză maple syrup urine disease). Decarboxilarea oxidativă a acizilor aminați cu catenă ramificată este un proces complex decurgând în cinci etape și implicând legarea coenzimei A (CoA). Din acest motiv complexul enzimatic mai sus amintit a purtat și denumirea de β-cetotiolază, iar mai nou s-a adoptat notația prescurtată BCKADH (*branched chain ketoacid dehydrogenase*). O reprezentare mult simplificată a primelor două etape din metabolismul aminoacizilor cu catenă ramificată este redată în *Figura 12.19.*

În caz de blocare a decarboxilării (deficit de BCKADH) se ajunge la acumularea în plasmă atât a cetoacizilor cât și a aminacizilor cu catenă ramificată. Defectul metabolic are loc în ficat , dar excesul de cetoacizi cu catenă ramificată își exercită efectul nociv în creier. De fapt, demielinizatea care afectează sistemul nervos al copiilor cu deficit genetic în procesul de decarboxilare a cetoacizilor cu catenă ramificată prezintă o semnificație patogenică mult mai importantă decât mirosul urinilor emise de aceștia.

Studii axate pe histochimia sistemului nervos central au demonstrat că mielina, sintetizată de oligodendrocitele satelit atașate neuronilor este alcătuită din proteine (20-30%) și din lipide (70-80%), iar proteinele din mielină sunt bogate în leucină (leucine-rich repeats LRR). Aceasta, datorită catenei ramificate lipsită de grupări polare conferă proteinei un caracter hidrofob, având însă proprietatea de a lega componenta lipidică alcătuită din colesterol, fosfolipide și glicolipide. Sinteza lanțurilor peptidice și respectiv sinteza proteinei precede și orientează aderarea și fixarea lipidelor în mielină [7, 46].

Se presupune că excesul de cetoacizi cu catenă ramificată ar interfera competitiv cu leucina pentru fixarea în proteinele din mielină. Acționând în calitate de „analog chimic", cetoacidul cu catenă ramificată s-ar fixa prin gruparea carboxil la nivelul unui lanț peptidic în curs de formare, dar fiind lipsit de grupare amino va opri elongarea lanțului peptidic și implicit sinteza proteinei și mielinizarea. Lipsite de teaca de mielină cu rol izolator, expansiunile neuronale vor produce descărcări haotice ale impulsurilor electrice, ducând la perturbarea conexiunilor interneuronale și la dezorganizarea activităților neuropsihice.

Deficitul de glutamat decarboxilază și implicit scăderea producerii de acid γ aminobutiric (GABA) în nucelii bazali din creier a fost incriminată în patogeneza coreei Huntington, o boală cu transmitere autosomal dominantă. Manifestările clinice apar însă abia în jurul vârstei de 36-50 de ani, constând în mișcări coreiforme și progresiunea inexorabilă spre demență [51].

La scăderea concentrației de GABA contribuie nu doar deficitul de glutamat decarboxilază ci și o metabolizare accelerată a acestui aminoacid, așa cum se poate vedea în *Figura 12.20.*

Prin scăderea concentrației de GABA cu efect de atenuare a excitației și prin creșterea concentrației de acid glutamic cu efect excitator [18] se poate ajunge la fenomene excitotoxice [13]. De notat că administrarea unui analog chimic al GABA, Vigabatrin, având efect de inhibare ireversibilă a GABA transaminazei s-a soldat cu o creștere a concentrației intracelulare a acestui neurotransmițător și cu oprirea spasmelor și convulsiilor infantile, fiind util în coreea Huntington [4, 57]. Pe de altă parte, mutația Q951X în gena receptorului pentru GABA notat GABRG2 s-a soldat cu epilepsie generalizată și convulsii febrile [24].

Cele câteva anomalii enzimatice cu repercusiuni asupra funcțiilor neuropsihice sunt doar exemple ilustrative pentru o astfel de asociere patogenă.

S-au constatat numeroase alte situații în care diverse anomalii psihice (boala Alzheimer, schizofrenia, coreea Huntington) evoluau cu modificări asociate ale neurotransmițătorilor (GABA, serotonină, acid glutamic, dopamină) dar în care

nu se putea face legătura certă între o anumită anomalie enzimatică şi o bine precizată disfuncție neuropsihică. De fapt, în cazuri în care anomalia enzimatică duce la acumulări de metaboliți în lizozomii din diferite organe, inclusiv din creier, dezvoltându-se tezaurismoze (sfingolipidoze, mucopolizaharidoze, leucodistrofii), infiltrația afectează mai multe organe, iar leziunile cerebrale sunt difuze [45]; prezentarea diferitelor forme de manifestare ale acestor anomalii ar depăşi însă cadrul acestui subcapitol.

Bibliografie selectivă

1. Adolph L., Lorenz R. Enzyme diagnosis in diseases of the heart, liver and pancreas. S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 1982.
2. Annoni G., Chirillo R., Swanie D. Prognostic value of mitochondrial aspartate aminotransferase in acute myocardial infarction. Clinical Biochemistry, 1986, 19, 235-238.
3. Arvanitakis C., Greenberger N.J. Diagnosis of pancreatic disease by syntetic peptide. A new test of exocrine pancreatic function. Lancet, 1976, 1: 663-666.
4. Banaie D. A., Sarbaz Y., Gharibzadeh S., Towhidkhah F. Huntington disease: modeling the gait disorder and proposing novel treatments. J Theor Biol 2008, 254(2):361-367
5. Bosi G, Bajorin DF, Sheinfeld J, Metzer AJ. Cancer of the testis. in DeVita Helmman Rosenberg (Eds) Cancer. Principles and Practice of Oncology. 5th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1997, pp 1397-1425.
6. Chapman J. F., Woodard L.L., Silverman L.M. Alkaline phosphatase izoenzymes in Kaplan and Pesce (Editors). Clinical chemistry C.V.Comp. St.Louis, Toronto, Princenton, 1984, 1098-1101.
7. Chen Y., Aulia S., Li L.,Tang B.L. et al. An emerging family of brain-enriched neuronal growth modulationg type I transmembrane proteins with leucine rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. Brain Research Reviews 2006, 56: 265-274
8. Cucuianu A., Trif I., Cucuianu M., Petrov L., Pațiu M., Basarab C. Serum lactate dehydrogenase and alcaline phosphatase activities and serum cholesterol level in bone marrow blood. Rev.Roum.Med.Int., 1996, 34, 173-182.
9. Cucuianu M., Bornuz F., Macavei I. Effect of L-asparaginase upon serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin levels in patients with acute leukemia. Clin.Chim.Acta, 1972, 38, 97-102.
10. Cucuianu M., Deac M., Bornuz F., Macavei I. Effect of L-asparaginase therapy upon some indices of protein metabolism in leukemic patients. Rev.Roum.Med.Int., 1973, 10, 121-131.
11. Cucuianu M., Dosan L., Hoinărescu E., Pintea L., Fischer S. Comportarea lacticodehidrogenazei, colinesterazei şi g-glutamiltransferazei în sindroamele anemice. Clujul Medical, 1984, 57, 103-109.
12. Cucuianu M., Trif I., Cucuianu A. Hemostaza. Biochimie, Fiziopatologie, Clinică. Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1994.
13. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease:implications for therapy. Pharmacol Ther 1999, 81:163-221
14. Dubach D.C. Enzymes in urine and kidney. Ed.Hans huber Bern-Stuttgart, 1968.
15. Elias E., Redshaw M., Wood T. Diagnostic importance of changes in circulating concentrations of immunoreactive trypsin. Lancet 1977, 11, 66-68.
16. Fernstrom J.D., Fernstrom MH. Phenylalanine and catecholamine synthesis and function. J Nutr 2007, 137: 1539S-1547S
17. Ferraris A.M., Giuntini P., Gaetani G.P. Serum lactic dehydrogenase activity as a prognostic tool for Non-Hodgkin Lymphoma. Blood, 1979, 54, 928-932.
18. Frayn K.N. Metabolic regulation. A human perspective. Blackwell Science Ltd 2003
19. Gelehrter T.D. Enzyme induction. New Eng. J.Med., 1976, 924, 522-526, 589-595, 646-651.
20. Goldberg D.M. The exepading role of microsomal enzyme induction, and its implications for clinical chemistry. Clinical chemistry, 1980, 26, 691-699.
21. Gordon N. Segawa's disease: dopa-responsive dystonia. J Clin Pract 2008, 62(6): 943-946
22. Hyland K. Inherited disorders affecting dopamine and serotonin, critical neurotransmitters derived from aromatic acids. J Nutr 2007, 137: 1568S-1572S
23. Kamrowska A. Association between the TPH2 gene and suicidal behavior. Pol Merkur Lekarski 2007, 23(136):315-316
24. Kang J. Q., Shen W., MacDonald R.L. the GABRG2 mutation Q351X, associated with

generalized epilepsy with febrile seizures plus, has both loss of function and dominant - negative suppression. Neurosci 2009, 29 (9): 2845-2856

25. Khalife A., Cebotaru C, Cucuianu M. Excesively increased serum lactate dehydrogenase in a patient with germ-cell tumor. Clujul Medical 1999, 72: 82-84.
26. Kluge A., Hang H. Durch Thrombocyten bedingte Enzymaktivitatserhohung. Med.Welt, 1970, 21/46, 1981-1984.
27. Kornberg A., Polliak A. Serum lactate dehydrogenase levels in acute leukemia. Marked elevations in lymphoblastik leukemia. Blood, 1980, 56, 351-355.
28. Linder M.E., Gilma A.G. G Proteins Scientific American, 1992, 267, 56-65.
29. Lűdecke B., Dworniecczak B., Bartholome K.A. A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. Hum Genet 1995, 95(1): 123-125
30. Meyer-Bertenrath J.G. Enzym diagnostik Die Medizinische Verlagsgesellschaf Marburg/ Lahn, 1976.
31. Mitchell C.J., Humphrey C.S., Bullen A.W., Kelleher J. The diagnostic value of the oral pancreatic function test. Scand.J.Gastroenteral, 1979, 14, 183-187.
32. Muller C.P., Wagner A.V., Mancher C., Steinke B. Hypocholesterolemia, an unfavorable feature of prognostic value in chronic myelogenous leukemia. Eur.J.Haematol.1989,43, 235-239.
33. Neville B.G.R., Parascandelo R., Ferrugia R., Felice A. Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa responsive motor and cognitive disorder. Brain 2005, 128:2291-2296
34. Oosting J.D., Derksen R.H.W.M., Bobbink I.W.G., Hackeng T.M., Bouma B.N., de Groot P.G. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S. An explanation for their pathogenic mechanism ? Blood, 1993, 81, 2618-2625.
35. Pfaff G., Beyer A. Maligne Hyperthermie. Annaestiologie und Intensivmedizin, 1981, 22, 67-74.
36. Preti HA, Logothesis JL. Testicular tumors. in Pazdur (editor). Medical Oncology. A comprehensive review. PRR Hunctinton. New York, 1993, pp.295-311.
37. Puschendorf B., Dienstl F. Kardiales Troponim T-ein hochspezifischer Laborparameter für den akuten Myokardschaden. Labor Aktuel, 1995, 5, 5-9.
38. Richterich R. Enzymopathologie. Ed.Springer Berlin-Gottingen-Heidelberg, 1958.
39. Rodwell V. Enzymes in Harper (Editors). Review of Physiological Chemistry ed.14 Lange Med.Publ.Los Altos, Calif. 1973.
40. Rodwell V.W. Maple syrup disease (Branched chain-ketonuria) in Murray, Granner, Mayes, Rodwell (Editors). Harpers Biochemistry Appleton and Lange, 1996:329-330
41. Schmidt E., Schmidt F.W. Enzym Fibel Boehringer Mannheim GmbH, 1971.
42. Schmidt E., Schmidt F.W. Klinische Pathophysiologie 3rd Edition Ed.Thieme, Stuttgart, 1975.
43. Segawa M., Nomura Y., Nishyama N. Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease). Ann Neurol 2003, 54 (suppl 6): 532-545
44. Shapiro S.S., Siegel J.E. Hemorrhagic disorders associated with circulating inhibitors in Ratnoff and Forbes (Editors). Disorders of Hemostasis, 1991, 245-266.
45. Shaw D. M. The role of the laboratory in some psychiatric illnesses. In Williams and Marks (Editors). Biochemistry in Clinical Practice William Heinemann Medical Books London 1983, 523-558.
46. Sherman D.L., Brophy P.C. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. Nat Rev Neurosci 2005, 6: 683-690
47. Shipp M. A predictive model for aggressive non-Hodgkin lymphoma. The non-Hodgkin Lymphome prognostic factors project. N.Eng.J.Med, 1993, 329, 987-992.
48. Simon, S.D., Kim H.C., Wu H.V., Saidi P. Serum lactic dehydrogenase activity in refractory megaloblastic anemia. Blood, 1978, 52, suppl.1, Abstr. 46 pag.90.
49. Sjoerdsma A., Lowenberg W., Engelman K et al. Serotonin now: clinical implication of inhibiting its synthesis by parachlorphenylalanine. Ann Int Med, 1970,73:607-629
50. Statland BB, Winkel P. Neoplasia in Kaplan and Pesce (Editors) Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation. St.Louis-Toronto-Princenton, 1984, pp. 882-896.
51. Stern I. Hereditary and acquired mental deficiency. In Williams and Marks (Editors). Biochemistry in Clinical Practice. William Heinemann Medical Books London 1983, 489-523

52. Sunder-Plassmann G. ANCA - Neue diagnostiche aspekte in der nephrologie. Labor Aktuel, 1991, 3, 10-13.
53. Swan H.J.C., Ganz W. Thrombolysis in acute myocardial infarction in Sobel, Collen, Grossbard (Editors). Tissue plasminogen activator in thrombolytic therapy. Marcel Dekker, inc.New-York and Basel 1987, 57-74.
54. Tan I.K., Chio L.E., Teow-Suak L. Heat stability of serum alkaline phosphatase in bone and liver diseases. Clin.Chim.Acta, 1972, 41, 329-334.
55. Wewalka,F. Enzyme bei knochenerkraukungen und Cholestase in F.W.Schidt (Editor) Praktische Enzymologie Ed.Hans Huber Bern, Stuttgart, 1968, 319-354.
56. Williams D.L., Marks V. Biochemistry in clinical practice. William Heineman Medical Books Limited, London 1983, pp. 273-274.
57. Willmore L. J., Abelson M. B., Ben-Menachem E., Pellock I.M.,Schields W.D. Vigabatrin: 2008 update. Epilepsia 2009, 50 (2):163-173
58. Zhang X., Gainetdinov R.R., Beualieu J. M. et al. Function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. Neuron 2005, 57(3):246-251.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 13.
Biochimia, fiziologia şi patologia hemostazei

Ioana Brudaşcă

13.1 Hemostaza – noţiuni introductive

Hemostaza reprezintă ansamblul proceselor fiziologice care concură la prevenirea sângerărilor spontane şi la oprirea hemoragiei în caz de leziune vasculară. Ea participă la repararea breşei vasculare şi contribuie la menţinerea integrităţii sistemului vascular. Totodată hemostaza previne extinderea intravasculară a fibrinoformării şi obturarea vaselor.

Etapele hemostazei sunt reprezentate de :

- Hemostaza primară
  - timp vascular
  - timp plachetar (plachete şi factor von Willebrand)
- Coagulare – factori activatori şi inhibitori
- Fibrinoliză.

În hemostaza primară intervine peretele vascular, care participă prin vasoconstricţie şi prin intervenţia activă a celulelor endoteliale şi a componentelor structurale subendoteliale.

Plachetele sangvine migrează la sediul leziunii şi în urma unei succesiuni de procese aderă de subendoteliu şi se leagă între ele prin punţi de fibrinogen, fenomen denumit agregare plachetară. Legarea plachetelor de subendoteliu precum şi agregarea lor sunt mediate de un factor plasmatic denumit factorul von Willebrand (vWF). Etapa hemostazei primare se finalizează prin formarea unui tromb plachetar.

În procesul coagulării intervin proteine care circulă în formă inactivă, de zimogeni, şi care sunt activate în cascadă. Coagularea este iniţiată de factorul VIIa (singurul factor care circulă în proporţie substanţială în formă activată), care se leagă de factorul tisular de pe suprafaţa celulelor endoteliale şi a monocitelor, la nivelul leziunii vasculare. Complexul factor tisular factor - VIIa activează factorul X şi factorul IX (*Figura 13.1*). Forma activă a factorului X (Xa), în prezenţa factorului Va activează proteolitic protrombina în trombină (IIa), enzima cheie a coagulării. Trombina clivează fibrinogenul solubil transformându-l în fibrină, care consolidează dopul hemostatic. Trombina activează, de asemenea:

- factorul XIII, care leagă covalent monomerii de fibrină între ei;
- plachetele, prin intermediul unui receptor de suprafaţă pe care trombina îl clivează;
- factorii XI, V şi VIII, precum şi inhibitorul fibrinolizei activabil de către trombină (TAFI), toate aceste efecte ale trombinei fiind protrombotice.

Trombina are şi un efect anticoagulant prin legarea ei de trombomodulină (o proteină endotelială), acest complex activând proteina C.

Generarea necontrolată de trombină este limitată de o serie de proteine reglatoare. Complexul factor VII/ factor tisular este inactivat prompt de inhibitorul căii mediate de factorul tisular (TFPI). Antitrombina III inactivează trombina şi factorii Xa, IXa şi XIa, proces accelerat de 1000 de ori în prezenţa heparinei sau a heparan sulfatului. Proteina C activată în prezenţa cofactorului ei, proteina S, inactivează proteolitic factorii Va şi VIIIa, limitând astfel generarea de trombină. Factorul Xa este inactivat de proteina Z, dependentă de vitamina K.

Prin formarea trombului fibrinoplachetar breşa vasculară este obturată iar extravazarea sângelui este stopată. După regenerarea endote-

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

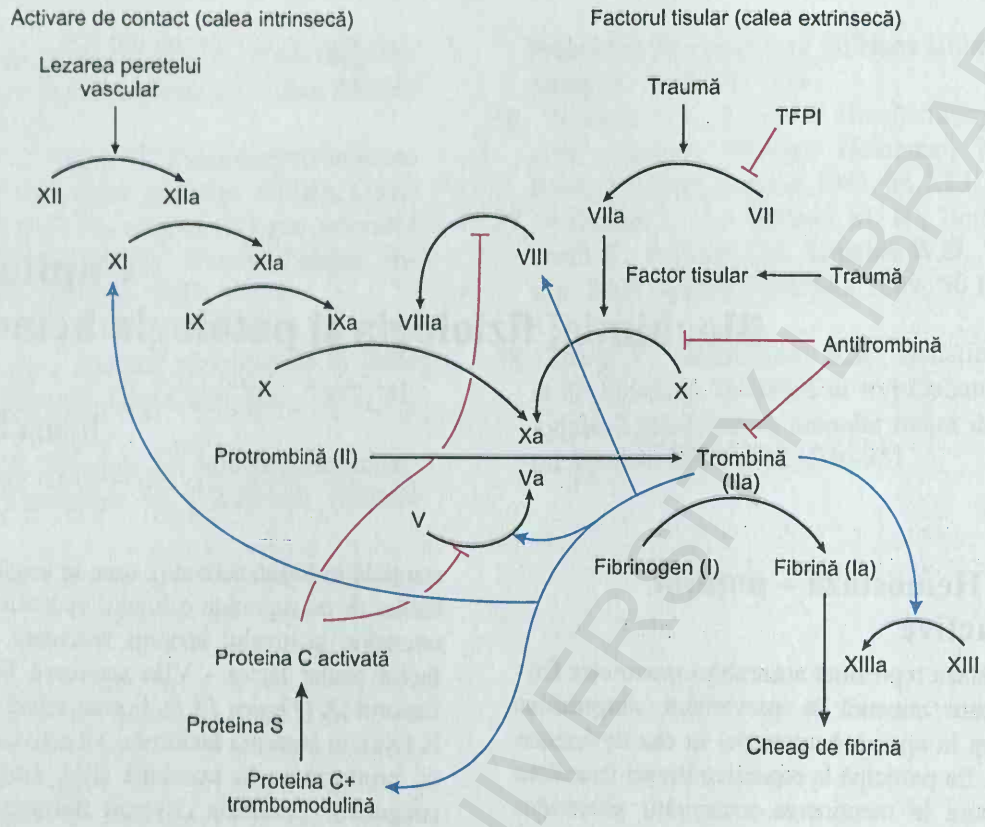


Figura 13.1. Reprezentare schematică a procesului de hemostază

liului vascular trombul este îndepărtat prin procesul de fibrinoliză, care constă în degradarea proteolitică a fibrinei de către plasmină.

Formarea plasminei din precursorul său inactiv - plasminogenul, este asigurată de activatorii fibrinolizei. Aceştia sunt activatorul tisular al plasminogenului (t-PA), sintetizat şi eliberat de către endoteliile vasculare, urokinaza (u-PA), care se găseşte în special la nivelul epiteliilor mucoase, precum şi de sistemul de activare intrinsec (factorul XII, kininogenul cu masă moleculară mare şi kalikreina).

Fibrinoliza se găseşte sub controlul unor mecanisme care previn îndepărtarea prematură a trombului, precum şi declanşarea unei fibrinolize sistemice. Aceşti inhibitori sunt reprezentaţi de inhibitorul activatorului plasminogenului (PAI), care inhibă acţiunea t-PA, de α2 antiplasmină, un inhibitor de proteaze care neutralizează plasmina şi de TAFI (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*), care limitează degradarea fibrinei de către plasmină.

Echilibrul între activarea factorilor coagulării şi mecanismele anticoagulante şi fibrinolitice asigură un status normal al hemostazei, iar perturbările acestui echilibru conduc la apariţia hemoragiilor sau trombozelor.

13.2 Hemostaza primară

13.2.1 Intervenţia componentei vasculare

Peretele vascular intervine în hemostază prin vasoconstricţie şi prin implicarea endoteliului.

13.2.1.1 Rolul vasoconstricţiei

În economia generală a hemostazei vasoconstricţia are un efect tranzitoriu şi cu importanţă relativ redusă. Ea se datorează contracţiei celulelor musculare netede ale vaselor mici. La nivelul capilarelor (care nu sunt contractile) leziunea endotelială poate fi obturată prin aderarea celulelor endoteliale între ele.

Vasoconstricţia opreşte temporar extravazarea sângelui şi favorizează etapele ulterioare ale hemostazei, prin acumularea de plachete la nivelul leziunii vasculare.

Printre mecanismele care produc şi întreţin vasoconstricţia se numără secreţia de serotonină şi de tromboxan A2 (TxA2) din plachetele activate, precum şi eliberarea unui puternic vasoconstrictor endotelial - endotelina.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.I. Compuşi care conferă proprietăţi antitrombotice endoteliilor

Compuşi cu rol antiplachetar
• PGI2, EDRF, ADP-ază – rol vasodilatator şi în inhibarea plachetelor
Compuşi cu rol anticoagulant
• Heparansulfat (activează antitrombina III) şi dermatansulfat (activează cofactorul II al heparinei)
• Trombomodulina – activează sistemul proteinei C
• TFPI – limitează acţiunea complexului factor tisular/ factor VII
Compuşi cu rol profibrinolitic
• t-PA (activator al fibrinolizei)

Tabelul 13.II. Anomalii vasculare asociate cu perturbări ale hemostazei

I. Anomalii cu caracter genetic
• *anomalii ale peretelui vascular* (teleangiectazia hemoragică ereditară, ataxia teleangiectazică, hemangiomul cavernos, boala Fabry)
• *anomalii ale ţesutului conjunctiv perivascular* (sindromul Ehlers Danlos, sindromul Marfan, osteogeneza imperfectă, pseudoxantomul elastic)
II. Anomalii cu caracter dobândit
• *purpure mecanice* (posttraumatice, creşterea presiunii venoase retrograde)
• *purpure prin atrofia ţesutului de susţinere* (purpura senilă, scorbut, amiloidoză, exces de corticosteroizi)
• *purpure medicamentoase*
• *purpure în context infecţios*
• *vasculite* (purpura Henoch Schonlein)
• *purpure prin obstrucţii vasculare* (paraproteinemii, crioglobulinemii, embolii grăsoase)
• *purpure idiopatice* (autosensibilizare faţă de eritrocite, autosensibilizare faţă de ADN, purpura pigmentată progresivă)

13.2.1.2 Rolul endoteliilor vasculare

Endoteliile vasculare integre morfologic şi neperturbate funcţional au proprietăţi antitrombotice, datorită sintezei unor compuşi cu rol antiplachetar, anticoagulant şi profibrinolitic, care sunt prezentaţi în *Tabelul 13.I.*

În cazul leziunilor endoteliale cauzate de endotoxine, radicali superoxid sau prin stimularea de către citokinele proinflamatorii, în endotelii predomină mecanismele protrombotice: eliberare de vWF, expunere de factor tisular (cu rol în declanşarea coagulării pe cale extrinsecă), reducerea activităţii fibrinolitice prin eliberare crescută de PAI, expunerea unor molecule de adeziune care favorizează activarea locală a plachetelor şi leucocitelor (VCAM, *Vascular Cells Adhesion Molecule*, ELAM, *Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule*).

Chiar în absenţa expunerii la stimuli, endoteliile intacte sintetizează şi secretă şi componente protrombotice, cum ar fi vWF cu rol în aderarea şi agregarea plachetară, factorul VIII cu rol în coagulare şi PAI cu rol în inhibarea fibrinolizei. Totuşi, în endoteliile intacte predomină mecanismele antitrombotice.

13.2.1.3 Rolul structurilor subendoteliale

Prin producerea unei leziuni vasculare se expun fibre de colagen, microfibrile de elastină şi membrana bazală, elemente de care aderă plachetele fie direct, fie prin intermediul vWF. Contactul plasmei cu structurile subendoteliale duce la activarea coagulării pe cale intrinsecă, prin activarea factorului XII.

13.2.1.4 Aspecte patologice ale hemostazei care interesează peretele vascular

Afectarea vasculară se traduce din punct de vedere clinic prin leziuni diseminate, de obicei de dimensiuni mici (peteşii), mai rar sub formă de echimoze. În *Tabelul 13.II* sunt prezentate principalele anomalii vasculare asociate cu perturbări ale hemostazei.

13.2.2 Plachetele sangvine (trombocitele)

Plachetele sangvine intervin în oprirea hemoragiei prin aderarea lor la peretele vascular şi prin formarea de agregate, generând trombul plachetar, care ulterior va fi consolidat de fibrină.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.III. Glicoproteine ale membranei plachetare

Glicoproteine	Semnificaţie funcţională
Gp Ia	Împreună cu GpIIa formează un receptor pentru colagen şi intervine în aderarea plachetelor la structurile subendoteliale
Gp Ib	Împreună cu GpIX, constituie un receptor pentru vWF prin intermediul căruia plachetele se leagă de peretele vascular. Este receptor pentru trombină
Gp IIb/IIIa	Leagă fibrinogenul, vWF şi fibronectina, asigurând agregarea plachetelor activate
Gp IV	Este receptor pentru trombospondină şi colagen

Plachetele sangvine îşi au originea în măduva hematopoetică şi provin din fragmentarea citoplasmei megacariocitelor. Controlul producerii şi eliberării plachetelor din măduvă se exercită prin intermediul a două tipuri de trombopoetină: una care stimulează diferenţierea în direcţie megacariocitară a celulei stem pluripotente şi cealaltă care influenţează maturarea seriei megacariocitare.

În arborele vascular numărul de plachete este de 150.000- 400.000/mm^3, circa o treime din totalul acestora fiind însă sechestrată în sinusurile venoase din splină şi ficat. Durata de viaţă a plachetelor este de 8-10 zile.

13.2.2.1 Structură

Plachetele sunt fragmente celulare anucleate, cu formă discoidală în stare de repaus şi având diametrul maxim de 2,5-4 μm.

Membrana

Plachetele sunt delimitate de o membrană formată dintr-un dublu strat fosfolipidic, care se invaginează în unele regiuni, putând suferi rearanjări în condiţiile activării plachetare, expunând fosfolipide cu rol în coagulare (factorul plachetar 3, PF3). În structura membranei sunt înglobate glicoproteine cu rol de receptor, care intervin în procesele de aderare şi agregare plachetară. Rolul acestor glicoproteine este prezentat în *Tabelul 13.III.*

Citoscheletul şi proteinele contractile

Aceste proteine asigură modificările de formă ale plachetelor şi emiterea de prelungiri (filipode) şi sunt reprezentate de actină şi miozină. Citoscheletul conţine şi un sistem circumferenţial microtubular, cu rol în schimburile de substanţe cu mediul extern şi în menţinerea formei discoidale.

Sistemul de granule *(Figura 13.2)*

Granulele α conţin proteine specifice plachetelor, cum ar fi factorul plachetar 4 (PF4), cu efect de inhibare a heparinei, β tromboglobulina (β TG) şi factorul de creştere endotelial derivat din plachete (PDGF). PF4 şi β TG sunt consideraţi markeri ai activării *in vivo* a plachetelor sangvine. Prin acţiunea sa mitogenă, PDGF intervine în condiţii fiziologice în procesul de reparare a leziunilor, iar în mod patologic contribuie la progresiunea plăcilor ateromatoase (prin stimularea proliferării celulelor musculare netede şi a fibroblaştilor). Granulele α conţin şi fibrinogen, factor V şi vWF, care se eliberează în plasmă în urma activării plachetelor, precum şi trombospondină, o proteină cu rol în consolidarea agregatului plachetar.

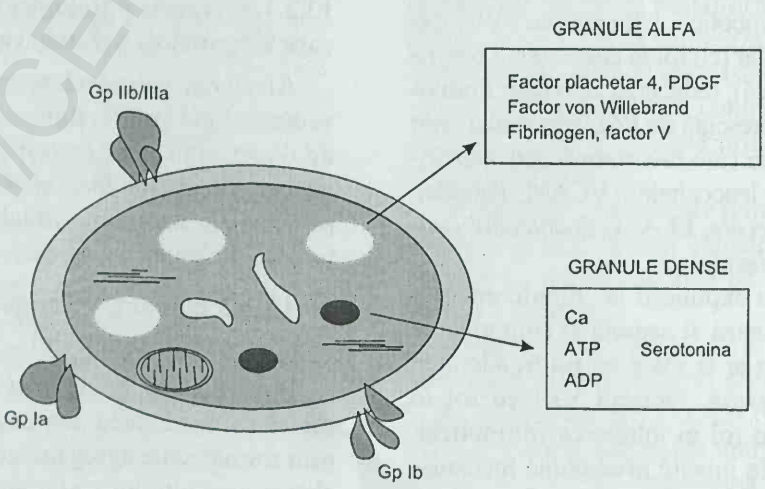


Figura 13.2. Structura plachetelor sangvine

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

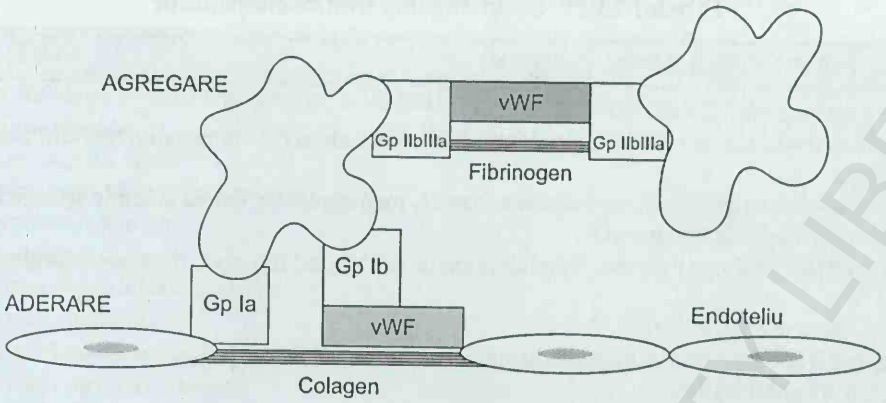


Figura 13.3. Aderarea şi agregarea plachetară

Granulele dense conţin ATP, ADP (fiind un rezervor de stocare a nucleotidelor), serotonină (care prin eliberare exercită un efect vasoconstrictor) şi calciu. Calciul este stocat şi la nivelul unui sistem tubular dens, similar cu reticulul sarcoplasmic muscular.

13.2.2.2 Răspunsul plachetelor la stimuli

Stimulii fiziologici ai plachetelor sunt reprezentaţi de trombină (în concentraţii mult mai scăzute decât cele necesare coagulării), colagen, ADP, acid arahidonic şi adrenalină. În condiţii patologice, plachetele pot fi stimulate de către complexe antigen-anticorp, unele virusuri şi de către factorul activator plachetar (PAF) eliberat de leucocitele activate. De notat că efectele diferiţilor stimuli se pot suma.

Secvenţa de procese în cazul existenţei unei leziuni vasculare se traduce prin aderarea plachetară de straturile subendoteliale, activarea lor (implicând modificări de formă şi secreţia conţinutului granulelor) şi agregarea plachetelor între ele (*Figura 13.3*).

Aderarea plachetară se produce în condiţiile expunerii colagenului şi microfibrilelor subendoteliale, de care plachetele se leagă fie direct prin intermediul GpIa/IIa, fie prin intermediul vWF, care se leagă de complexul GpIb/IX. Aderarea este influenţată de regimul de curgere al sângelui, de forţele de frecare care împing plachetele spre peretele vascular şi le desprind pe cele care nu au fost bine fixate, precum şi de eliberarea de ADP (cu efect de favorizare a adezivităţii) din hematii.

Activarea plachetelor se produce în urma cuplării stimulilor cu receptorii membranari. Ea implică procese de transducţie a semnalului prin intermediul proteinelor G şi a unor mesageri secundari (cAMP, diacilglicerol şi inozitoltrifosfat) care acţionează prin modificarea conţinutului în ioni de calciu al citoplasmei, respectiv contracţia proteinelor din citoschelet. Aceasta va antrena modificări de formă ale plachetelor, care devin sferice, emit prelungiri, se expun glicoproteinele membranare, iar granulele se concentrează spre centrul plachetei. Conţinutul granulelor α şi al granulelor dense este expulzat, iar secreţia conţinutului granulelor dense duce la eliberarea de ADP, stimul al agregării plachetare. De fapt, secreţia plachetară survine în strânsă legătură şi concomitent cu agregarea plachetelor, influenţând cinetica şi amplitudinea acesteia.

Prin transformarea acidului arahidonic citoplasmatic sub acţiunea ciclooxigenazei se formează endoperoxizi, care sub acţiunea tromboxan sintetazei generează tromboxan A2 (TxA2); acesta odată eliberat la exterior are un puternic efect agregant asupra plachetelor şi un efect vasoconstrictor. De menţionat că la nivelul endoteliilor, aceeaşi cale metabolică conduce la formarea din endoperoxizi a prostaciclinei (PGI2), cu efect antiagregant şi vasodilatator, sub acţiunea prostaciclin sintetazei.

Agregarea plachetară se realizează prin legarea plachetelor între ele prin intermediul moleculelor de fibrinogen.

În urma activării, pe suprafaţa fiecărei plachete se expun circa 50.000 de receptori GpIIb/IIIa, la care se fixează fibrinogenul prin punţi de ioni de calciu. Fibrinogenul necesar agregării se eliberează chiar din granulele α prin stimularea de către trombină sau colagen, iar ADP-ul eliberat din granulele dense amplifică efectul agregant al stimulului primar. Un efect amplificator asupra agregării îl are şi TxA2, generat prin transformarea endoperoxizilor.

Tabelul 13.IV. Etiopatogenia trombocitopeniilor

I. SCĂDEREA PRODUCŢIEI DE PLACHETE
1. *Reducerea megacariocitelor la nivel medular*
a. invadare medulară în neoplazii (leucemii, limfoame, metastaze tumorale), mielofibroză, granulomatoze
b. hipoplazie medulară (iradiere, substanţe toxice, medicamente, viroze, anemie aplastică, hemoglobinurie paroxistică nocturnă)
c. congenitale (sindrom Fanconi, trombocitopenie autosomal recesivă, trombocitopenia cu absenţa radiusului)
2. *Trombocitopoeză ineficientă*
a. hemopatii maligne, sindrom mielodisplazic
b. anemie megaloblastică
3. *Sindroame ereditare* (trombopoeză ineficientă asociată cu anomalii funcţionale plachetare şi cu diverse malformaţii)
a. sindromul Bernard Soulier
b. sindromul plachetelor cenuşii (deficit de granule α)
c. anomalia May Hegglin
d. sindromul Wiskott- Aldrich
II. SCĂDEREA DURATEI DE VIAŢĂ A PLACHETELOR
1. *Distrucţie prin mecanism imun*
a. trombocitopenia medicamentoasă (heparină, săruri de aur, chinină şi chinidină)
b. purpura posttransfuzională
c. purpura neonatală autoimună
d. infecţia cu HIV
e. purpura trombocitopenică idiopatică
2. *Consum excesiv de plachete*
a. purpură trombotică trombocitopenică
b. sindromul hemolitic uremic
c. coagularea intravasculară diseminată
d. stări septice
e. circulaţie extracorporeală, proteze valvulare mecanice
f. hemangiom cavernos (sindrom Kasabach-Merritt)
III. SECHESTRARE ÎN SPLINĂ
IV. TROMBOCITOPENIE DILUŢIONALĂ

13.2.2.3 Rolul plachetelor în coagulare

Intervenţia plachetelor în coagulare se exercită la multiple nivele. Astfel, ele intervin în activarea prin contact a factorului XII, care aderă la suprafaţa plachetelor împreună cu kalikreina, fiind favorizată acţiunea activatoare a acesteia asupra zimogenului factorului XII.

Plachetele contribuie la activarea factorului XI de către kalikreină în prezenţa kininogenului cu masă moleculară mare (HMWK) printr-un mecanism independent de factorul XII.

Prin furnizarea de suprafeţe fosfolipidice, plachetele favorizează interacţiunea dintre factorul IXa şi zimogenul factorului X, în prezenţa factorului VIII, precum şi generarea trombinei sub acţiunea factorului Xa în prezenţa factorului V. Fosfolipidele plachetare intervin şi în activarea sistemului proteinei C.

13.2.2.4 Rolul plachetelor în fibrinoliză

Interrelaţia dintre plachete şi fibrinoliză este extrem de complexă. La suprafaţa plachetelor este favorizată interacţiunea dintre plasminogen şi activatori, iar prin retracţia cheagului, reţeaua de fibrină de care s-au legat plasminogenul şi t-PA este îndepărtată de mediul plasmatic bogat în inhibitori ai fibrinolizei. Pe de altă parte, în cursul secreţiei plachetare se eliberează PAI-1 cu efect inhibitor, iar factorul XIII de origine plachetară intervine şi el la limitarea fibrinolizei, datorită efectului de încorporare a α2 antiplasminei în reţeaua de fibrină.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.V. Principalele cauze ale creşterii numărului de plachete

I. TROMBOCITOZE

1. **În stări fiziologice** (efort fizic intens, descărcări de catecolamine, ovulaţie, menstruaţie, lăuzie)
2. **În stări patologice**
   - *a. Reacţia de fază acută*
     - intervenţii chirurgicale majore
     - procese inflamatorii
     - neoplazii
   - *b. Regenerare medulară accelerată*
     - anemii hemolitice
     - anemii posthemoragice
     - anemii feriprive cronice
     - criza reticulocitară la debutul tratamentului anemiei megaloblastice
   - *c. Secreţie crescută de eritropoetină*
     - cardiopatii cianogene evoluând cu policitemie
     - tumori renale secretante de eritropoetină
   - *d. Postsplenectomie*

II. TROMBOCITEMII

1. **Afecţiuni mieloproliferative**
   a. În asociere cu policitemia vera, leucemie granulocitară cronică, metaplazeie mieloidă anterior apariţiei mielofibrozei
   b. Trombocitemia esenţială
2. **Sindroame mielodisplazice** (anemia refractară cu sideroblaşti inelari, sindromul 5q-)

13.2.2.5 Anomalii cantitative ale plachetelor

Scăderea numărului de plachete (trombocitopeniile)

Trombocitopenia se defineşte ca fiind scăderea numărului de plachete sub 100.000/mm^3. Trombocitopeniile constituie cea mai frecventă cauză a sindroamelor hemoragipare. Din punct de vedere clinic, trombocitopeniile se manifestă prin purpură la nivelul tegumentelor şi mucoaselor şi prin hemoragii de la nivelul mucoaselor (epistaxis, gingivoragii, metroragii, hematurie). Nu se poate stabili o corelaţie clară între severitatea trombocitopeniei şi intensitatea manifestărilor hemoragice, ţinând cont că aportul plachetelor la hemostază este dat atât de număr cât şi de funcţionalitatea lor.

Principalele mecanisme care pot duce la trombocitopenie sunt prezentate în *Tabelul 13. IV.*

Creşterea numărului de plachete (trombocitoze şi trombocitemii)

Trombocitozele reprezintă creşteri reactive şi tranzitorii ale numărului de plachete şi survin în diferite stări fiziologice (prin mobilizarea plachetelor de la nivel splenic) sau patologice (având ca mecanism creşterea producţiei de plachete).

Trombocitemiile apar în contextul unor hemopatii maligne şi în sindroamele mielodisplazice.

Principalele cauze ale creşterii numărului de trombocite sunt prezentate sintetic în *Tabelul 13. V.*

13.2.2.6 Anomalii calitative ale plachetelor sangvine (trombocitopatii)

Anomalii dobândite

Aceste anomalii funcţionale survin în boli renale, hepatice, colagenoze, hiperimunglobulinemii monoclonale, neoplazii, sindrom de coagulare intravasculară diseminată şi se asociază cu perturbări complexe ale coagulării şi fibrinolizei (aceste aspecte sunt discutate în legătură cu particularităţile hemostazei în diferite stări patologice).

De asemenea, numeroase medicamente din clase variate (antiinflamatoare nonsteroidiene, blocante ale canalelor de calciu, antidepresive triciclice, antihistaminice, blocanţi ai receptorilor adrenergici, anestezice locale, unele antibiotice etc.) pot influenţa funcţia plachetară.

Anomalii genetice

Sunt cauzate de defecte moleculare care pot perturba toate etapele prin care plachetele intervin în hemostază. Aceste anomalii pot fi suspectate atunci când timpul de sângerare este prelungit iar numărul de plachete este normal, sau trombopenia este uşoară (discordantă cu prelungirea timpului de

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.VI. Anomalii calitative genetice ale plachetelor

I. DEFECTE DE ADERARE
1. Sindrom Bernard Soulier – deficit de GpIb 2. Anomalia de tip sindrom pseudo von Willebrand – exces de GpIb pe membrana plachetară 3. Deficit de aderare la colagen – deficit de GpIa
II. DEFECTE DE ACTIVARE
1. Anomalii pe calea acidului arahidonic – deficit de ciclooxigenază sau tromboxan sintetază (anomalie de tip aspirinic) – deficite ale receptorilor pentru TxA2 2. Defecte de mobilizare a calciului
III. DEFECTE DE SECREŢIE
1. Deficite ale granulelor dense – boala rezervorului de stocare – absenţa granulelor dense – sindrom Hermanski Pudlak – sindrom Chediak Higashi – sindrom Wiskott Aldrich 2. Deficite ale granulelor α – sindromul plachetelor cenuşii (*gray platelet syndrome*)
IV. DEFECTE DE AGREGARE
1. Trombastenia Glanzmann – deficit de GpIIb/IIIa – lipsa agregării la stimulare cu ADP
V. DEFICITE FUNCŢIONALE ALE PLACHETELOR CAUZATE DE ANOMALII ALE UNOR PROTEINE PLASMATICE
1. Boala von Willebrand – plachetele nu aderă la structurile subendoteliale 2. Afibrinogenemia – nu se formează punţi de fibrinogen între plachetele activate, care nu agregă

sângerare). Diagnosticul diferenţial al acestor anomalii se face prin teste de agregare utilizând diferiţi stimuli şi prin tehnici de biologie moleculară.

Anomaliile funcţionale genetice ale plachetelor sunt prezentate în *Tabelul 13.VI*

13.2.3 Factorul von Willebrand (vWF)

13.2.3.1 Structură şi funcţie

Factorul von Willebrand este o glicoproteină care mediază interacţiunea dintre plachete, precum şi dintre acestea şi peretele vascular. De asemenea el transportă factorul VIII al coagulării, protejându-l de acţiunea proteazelor.

Factorul von Willebrand este sintetizat de endoteliile vasculare şi de către megakariocite. Sinteza lui este urmată de glicozilări şi de clivarea unui propeptid, în urma cărora rezultă monomeri (220-260 kDa) ce se unesc prin punţi disulfidice, formând dimeri. Aceştia vor polimeriza linear, ajungându-se la multimeri cu mase între 12.000 şi 20.000 kDa. Funcţionalitatea vWF depinde de gradul de polimerizare, multimerii de talie mare fiind mult mai eficienţi în interacţiunea cu plachetele.

Un domeniu al vWF se leagă de GpIb-IX din membrana plachetară, de colagen şi alte structuri ale matricii extracelulare, intervenind astfel în adeziunea plachetelor, iar un alt domeniu se leagă de factorul VIII al coagulării, pe care îl protejează de o degradare proteolitică precoce.

Secreţia vWF din endotelii se face atât către structurile subendoteliale, cât şi către lumenul vascular. Există o secreţie bazală, continuă de vWF şi una rapidă şi importantă cantitativ, declanşată de adrenalină, mediatori ai inflamaţiei (interleukina 1 (IL-1), TNF α, histamina, componentele C5a şi C5b ale complementului), anioni superoxid, endotoxine, vasopresină (şi un analog sintetic al acesteia, dezaminodextroarginvasopresina, DDAVp) şi acid nicotinic.

vWF este îndepărtat din circulaţie prin acţiunea unei metaloproteinaze sintetizate în ficat care poartă numele de ADAMTS-13 (*a disintegrin – like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13*) şi clivează cu predilecţie formele multimerice mari. ADAMTS - 13 este inactivată de către trombină. În condiţiile unui endoteliu intact, trombina se leagă preferenţial de trombomodulina expusă pe suprafaţa celulelor endoteliale, ADAMTS-13 fiind astfel disponibilă pentru a degrada vWF; acest mecanism limitează extinderea adeziunii şi agregării plachetare dincolo de sediul leziunii vasculare. În condiţiile unei generări masive de trombină (aşa cum se întâmplă de exemplu în coagularea intravasculară diseminată din şocul septic), aceasta va inactiva ADAMTS-13, iar în circulaţie vor persista forme multimerice mari şi funcţional active ale vWF. Mutaţii ale ADAMTS-13 sau inhibarea ei de către autoanticorpi sunt implicate în patogeneza purpurei trombotice trombocitopenice.

Tabelul 13.VII. Clasificarea bolii von Willebrand

	Transmitere Genetică	Timp de sângerare	vWF: Ag	VIIIC	Agregare Ris PRP	R:Cof PPP	Structură multimerică	Răspuns la DDAVP
Tip I	Autosomal dominantă	prelungit	Scăzut	Scăzut	Scăzută	Scăzut	Normală	Creşterea vWF în plasmă; corectare tarnzitorie a hemostazei
Tip IIA	Autosomal dominantă	prelungit	Scăzut sau normal	Uşor scăzut sau normal	Foarte scăzută	Mult scăzut	Absenţa multimerilor mari şi mijlocii în plasmă şi plachete	Creşterea formelor multimerice mici care nu corectează hemostaza
Tip IIB	Autosomal dominantă	prelungit	Scăzut sau normal	Uşor scăzut sau normal	Crescută	Moderat scăzut	Absenţa multimerilor mari în plasmă. Normală în plachete.	Nu corectează hemostaza, risc de trombocitopenie
Tip III	Autosomal recesivă	prelungit	Foarte scăzut sau absent	Foarte scăzut	Absentă	Absent	Variabil	Fără efect
Pseudo vW (tip plachetar)	Autosomal dominantă	prelungit	Scăzut sau normal	Uşor scăzut sau normal	Crescută	scăzut	Absenţa multimerilor mari din plasmă	Ineficient, risc de trombocitopenie

13.2.3.2 Factorul von Willebrand în patologie

Nivelul plasmatic al vWF depinde de rata secreţiei şi de ritmul degradării sale. Nivele crescute ale vWF pot fi întâlnite în numeroase stări patologice aşa cum sunt infarctul miocardic, intervenţiile chirurgicale, leucemia acută, eclampsia, sindromul nefrotic, hipertiroidismul, obezitatea abdominală sau ciroza hepatică decompensată. Mecanismele care determină creşterea secreţiei de vWF sunt reprezentate de stimularea adrenergică, acţiunea citokinelor proinflamatorii, stimularea endoteliilor de către condiţiile hemodinamice particulare (regim accelerat de curgere, scădere a presiunii coloidosmotice), sau perturbarea captării şi degradării vWF în ficat (ciroza hepatică).

Relevanţa pentru clinică a nivelelor crescute de vWF trebuie însă interpretată ţinând seama că funcţionalitatea vWF este dată de prezenţa formelor multimerice cu masă moleculară mare, iar determinarea vWF ca antigen (vWF:Ag) nu oferă informaţii în acest sens (nivele antigenice crescute se pot datora formelor cu masă moleculară mică şi cu funcţionalitate redusă).

Boala von Willebrand

Boala von Willebrand se datorează deficitului cantitativ sau anomaliilor vWF şi se situează pe locul doi ca incidenţă a anomaliilor moştenite ale hemostazei după hemofilia A.

Din punct de vedere clinic se caracterizează prin hemoragii ale mucoaselor (epistaxis, gingivoragii, menoragii, hemoragii spontane din lojele amigdaliene).

Diagnosticul de laborator se bazează pe efectuarea timpului de sângerare, determinarea antigenului vWF în plasmă (vWF:Ag), explorarea agregării plachetare la ristocetină în plasma bogată în plachete (*platelet rich plasma,* PRP), evaluarea capacităţii vWF din plasma săracă în plachete (*platelet poor plasma,* PPP) de a agrega în prezenţa ristocetinei o suspensie de plachete inactivate – aşa numitul Ristocetin cofactor (R:Cof), investigarea coagulării pe cale intrinsecă prin timpul de tromboplastină parţial activată (APTT) şi eventual dozarea factorului VIII, precum şi imunelectroforeza bidimensională a vWF şi electroforeza multimerilor vWF. Clasificarea bolii von Willebrand este prezentată în *Tabelul 13.VII.*

Tipul I este cauzat de un defect de eliberare a vWF din endotelii, ceea ce influenţează şi transportul factorului VIII, al cărui nivel este scăzut.

Tipul II A se caracterizează prin absenţa multimerilor mari şi mijlocii, fie datorită unui deficit de polimerizare, fie din cauza unei susceptibilităţi crescute a acestor la acţiunea ADAMTS-13.

Tipul II B anomalia constă într-o afinitate crescută pentru plachetele sangvine a formelor

multimerice mari (ceea ce explică agregabilitatea plachetară intensă la ristocetină), în timp ce formele multimerice mici şi mijlocii rămase în plasmă - deşi au determinanţi antigenici şi pot transporta factorul VIII - au o activitate slabă de agregare a plachetelor inactivate în prezenţa ristocetinei (R:Cof scăzut).

Au fost descrise şi alte tipuri (IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH) care au în comun cu tipurile IIA şi IIB absenţa formelor multimerice mari şi scăderea cofactorului ristocetinei. Diferă modul de transmitere genetică, rezistenţa diferită faţă de proteoliză şi aspectul electroforetic al multimerilor mici şi mijlocii.

Sindromul plachetar pseudo von Willebrand se caracterizează printr-o anomalie la nivelul plachetelor, constând într-o afinitate exagerată a GpIb faţă de vWF care este normal.

Tipul III se datorează unui defect de sinteză al vWF şi se traduce prin valori extrem de reduse ale vWF, dar şi ale factorului VIII. Clinic apare un sindrom hemoragic extrem de sever, în care manifestările pot lua şi forma hematoamelor musculare sau hemartrozelor.

13.2.4 Explorarea hemostazei primare

13.2.4.1 Timpul de sângerare

Este un test care explorează în mod global hemostaza primară; el depinde de calitatea vaselor, de numărul şi funcţia plachetelor sangvine, de vWF şi de fibrinogen.

Metoda Duke (practicată în mod curent în laboratoarele noastre) constă într-o incizie (cu lungime de 3mm, şi profunzime de 2 mm) practicată cu lanţeta în lobul urechii după dezinfecţia cu eter. În mod normal sângerarea se opreşte în mai puţin de 5 minute.

Metoda Ivy constă dintr-o incizie lungă de 1 cm şi adâncă de 1 mm efectuată pe faţa anterioară a antebraţului dezinfectat cu eter, pe care s-a aplicat o presiune de 40 mm Hg cu manşeta tensiometrului. Prin această metodă, timpul de sângerare fiziologic este de până la 10 minute.

Metoda Ivy 3 puncte este o variantă a celei de mai sus şi constă în efectuarea a 3 puncte de incizie pe antebraţ în condiţiile descrise anterior. Timpul de sângerare este sub 6 minute. Metoda permite şi colectarea cantităţii de sânge scurs, care este sub 100 µl.

Timpul de sângerare este influenţat de hematocrit, fiind grevat de anumite limite: are o valoare predictivă mediocră a sângerării, reproductibilitate slabă şi dependentă de operator, o sensibilitate limitată şi o fiabilitate redusă în caz de anomalii tegumentare.

13.2.4.2 Timpul de sângerare *in vitro* (timp de ocluzie)

Se efectuează pe un aparat denumit Platelet Function Analyzer (PFA) în care procesele de aderare şi agregare plachetară care apar în cursul unei leziuni vasculare sunt simulate *in vitro*. Analizorul conţine două tipuri de membrane, una acoperită cu colagen şi ADP, cealaltă cu colagen şi adrenalină. Sângele trece printr-un orificiu practicat în aceste membrane, fiind înregistrat timpul de ocluzie al orificiului. Timpul de ocluzie este de 60-120 sec pentru colagen/ ADP şi de 80-120 sec pentru colagen/ adrenalină. Acest test explorează global componentele hemostazei primare, exceptând componenta vasculară. Are o sensibilitate mare în cazul bolii von Willebrand şi al unor anomalii plachetare.

13.2.4.3 Numărătoarea plachetelor sangvine

Se efectuează în mod uzual din sângele prelevat pe EDTA şi are valori cuprinse între 150.000-400.000/mm^3. Există situaţii în care EDTA duce la aglutinarea plachetelor, la numărătoare apărând o falsă scădere a numărului acestora. În cazul unei asemenea suspiciuni se recomandă întinderea unui frotiu de sânge periferic colorat May Grunwald Giemsa, pe care se observă agregatele de plachete, urmată de numărătoarea plachetelor din sângele recoltat pe citrat de sodiu, unde se obţin valori reale.

13.2.4.4 Testele de agregare plachetară

Se efectuează pe un aparat denumit agregometru şi explorează funcţia plachetelor din plasma citratată bogată în plachete (PRP). Stimulii folosiţi sunt ADP-ul, colagenul, acidul arahidonic, trombina, ristocetina. La adăugarea acestor stimuli se produce o agregare a plachetelor, ceea ce va creşte transmisia optică a unui fascicul luminos care străbate PRP. Înregistrarea acestui traseu generează o curbă de agregare plachetară, din care se pot analiza latenţa demarării agregării, velocitatea şi intensitatea agregării în raport cu un martor.

Agregometria prin impedanţă utilizează sângele integral, iar agregarea plachetelor are loc pe suport solid, ceea ce simulează mai exact condiţiile *in vivo*. Această metodă se utilizează în special pentru monitorizarea eficienţei tratamentului antiplachetar. Unele tipuri de agregometre

pot determina simultan cu agregarea şi cantitatea de ATP eliberată din plachete, iar altele pot măsura fluxul de calciu eliberat intraplachetar.

Există şi alte teste care investighează funcţia plachetară, printre care se numără determinarea unor metaboliţi ai eicosanoidelor specifice plachetare şi testul RPFA (*Rapid Function Platelet Assay*) un test automatizat folosit pentru detectarea anomaliilor plachetare genetice şi dobândite şi pentru evaluarea efectului terapeutic al agenţilor antiplachetari.

13.2.4.5 Explorarea factorului von Willebrand

Aceste teste includ determinarea antigenului vWF în plasmă (vWF:Ag), prin metoda ELISA sau prin electroimunodifuzie (metoda Laurell) şi teste funcţionale. Acestea constau în studiul agregării plachetare la ristocetină în plasma bogată în plachete (PRP), precum şi evaluarea capacităţii vWF din plasma săracă în plachete (PPP) de a agrega în prezenţa ristocetinei o suspensie de plachete inactivate – aşa numitul Ristocetin cofactor (R:Cof). Pentru investigarea dimensiunii multimerilor de vWF se poate efectua imunelectroforeza bidimensională a vWF şi electroforeza multimerilor vWF.

13.3 Coagularea

Coagularea sângelui se realizează prin transformarea fibrinogenului solubil în fibrină insolubilă sub acţiunea trombinei. Formarea trombinei este asigurată de o adevărată cascadă enzimatică, alcătuită din activări succesive ale precursorilor inactivi ai factorilor coagulării prin procese de proteoliză limitată.

În funcţie de modalitatea şi viteza de activare a factorului X se disting două căi ale coagulării. Calea extrinsecă, mai rapidă, este amorsată de activarea factorului VII în contact cu factorul tisular (care în condiţii fiziologice nu vine în contact cu sângele circulant). Calea intrinsecă decurge ceva mai lent şi este iniţiată de către activarea factorilor XII şi XI prin contact cu structurile subendoteliale sau cu suprafeţe străine. Cele două căi nu pot fi însă privite ca două entităţi independente, între ele existând o multitudine de interacţiuni.

13.3.1 Factorii coagulării

În raport cu caracteristicile lor biochimice şi funcţionale, factorii coagulării pot fi grupaţi precum urmează:

- factorul tisular;
- proteaze serinice dependente de vitamina K (factorii, II, VII, IX şi X);
- factori cu rol în activarea prin contact a căii intrinseci (factorii XII, XI, kalikreina, kininogenul cu greutate moleculară mare HMWK);
- cofactori ai coagulării (factorii V, VIII), care formează complexe cu proteazele, contribuind la creşterea activităţii lor procoagulante;
- fibrinogenul, factorul XIII stabilizator al fibrinei şi fibronectina cu rol în formarea şi consolidarea reţelei de fibrină.

13.3.1.1 Factorul tisular (TF, tromboplastina tisulară)

Este o glicolipoproteină transmembranară care se leagă necovalent de fosfolipide. El este prezent în multe ţesuturi (fibroblaşti perivasculari, celule subendoteliale, celule endoteliale, creier, plămâni, rinichi, placentă). În mod normal, factorul tisular nu vine în contact cu sângele circulant. În condiţiile leziunii vasculare sau a stimulării celulelor endoteliale sau a monocitelor circulante de către citokine proinflamatorii, proteina C reactivă, anioni superoxid, particule de LDL oxidate, lizolecitină generată prin oxidarea LDL sau endotoxine, factorul tisular se expune la suprafaţa celulelor, amorsând prin legarea de factorul VIIa calea extrinsecă a coagulării. Legarea factorului VII de factorul tisular declanşează de asemenea şi procese de semnalizare intracelulară cu rol în angiogeneză şi apoptoză.

Este de menţionat faptul că intima vasculară situată în proximitatea unei plăci ateromatoase este foarte bogată în factor tisular, iar citokinele produse de celulele spumoase determină expunerea de factor tisular la suprafaţa celulelor endoteliale supraiacente, fapt ce creează premise de apariţie a trombozei.

13.3.1.2 Proteaze serinice dependente de vitamina K (factorii II, VII, IX, X)

Aceşti factori au o serie de caracteristici fizico-chimice comune:

- sunt adsorbabili pe suspensii de citrat de bariu, hidroxid de aluminiu şi fosfat tricalcic;
- au activitate protează, având în centrul activ serină (serin protează). Ei circulă în plasmă sub formă inactivă, de zimogeni;
- se sintetizează în ficat, sinteza lor hepatică fiind stimulată de un peptid rezultat prin activarea proteolitică a protrombinei;
- în structura lor se găseşte un domeniu bogat în resturi de acid glutamic (Gla);
- sinteza lor în formă activabilă depinde de prezenţa vitaminei K. Rolul vitaminei K este de a

favoriza acţiunea unei carboxilaze care furnizează factorilor amintiţi o grupare COOH la moleculele de acid glutamic menţionate mai sus. Radicalii de acid γ carboxiglutamic rezultaţi sunt în măsură să fixeze ionii de Ca^{2+}, aceste punţi de calciu servind la formarea de complexe la nivelul membranelor fosfolipidice între un factor activat şi substratul său (zimogenul factorului care urmează a fi activat). În absenţa sau antagonizarea vitaminei K, factorii respectivi sunt inactivabili, deci nefuncţionali, fiind denumiţi generic PIVKA (*protein induced by vitamin K absence or antagonism*).

Factorul II (protrombina)

Protrombina are o masă moleculară de 72.000 Da şi este activată de către complexul format de Xa, V, fosfolipide şi calciu. Activarea sa se produce printr-un proces de proteoliză limitată, în cursul căruia rezultă un peptid de clivare denumit fragment 1+2 (F1+2). Acest peptid stimulează sinteza hepatică de factori ai coagulării dependenţi de vitamina K, iar nivelul său în plasmă este un marker al generării protrombinei *in vivo*.

Trombina rezultată prin activarea protrombinei poate fi considerată enzima reglatoare principală a procesului de hemostază. Efectele trombinei ar putea fi astfel sistematizate:

- transformarea fibrinogenului în fibrină
- activarea factorului XIII stabilizator al fibrinei
- amplificarea sintezei de factori V şi VIII
- agregarea plachetelor sangvine
- legarea de trombomodulina endotelială care activează sistemul proteinei C (mecanism anticoagulant). De menţionat că, pe de altă parte, complexul trombină-trombomodulină activează şi TAFI (Inhibitorul Fibrinolizei Activat de Trombină) care generează modificări ale fibrinei ce o fac mai rezistentă la fibrinoliză.

Din cele prezentate mai sus reiese cu prisosinţă că reglarea activităţii trombinei este deosebit de complexă, având în vedere proprietatea ei de a difuza de la nivelul suprafeţei unde a fost generată, precum şi capacităţii sale de a cliva numeroase substrate. Recunoaşterea substratelor de către trombină este controlată de o serie de cofactori care acţionează prin fixarea trombinei pe diferite suprafeţe, prin blocarea legării substratului de anumite regiuni ale trombinei sau dimpotrivă prin generarea unor situsuri de legare a substratului, respectiv prin modularea allosterică a centrului activ al trombinei. Prin efectele pe care le au asupra hemostazei, aceşti cofactori pot fi procoagulanţi (GpIbα, fibrina, ionul de Na^+) sau anticoagulanţi (heparina, trombomodulina).

Factorul VII intervine în iniţierea coagulării pe cale extrinsecă prin formarea unui complex cu factorul tisular, participând însă şi la activarea căii intrinseci (prin activarea factorului IX). Factorul VII are o greutate moleculară de circa 50.000 Da şi este secretat de ficat sub forma unui singur lanţ polipeptidic.

Odată ajuns în plasmă, o parte a moleculelor de factor VII suferă un proces de clivare internă, sub acţiunea factorului XII (implicat în principal în activarea căii intrinseci), rezultând o formă cu două lanţuri polipeptidice şi denumit αVIIa sau VIIa. Această formă are o afinitate ridicată faţă de factorul tisular, complexul format fiind de zeci de ori mai activ în procesul de coagulare decât complexul factor tisular-factor VII (cu un singur lanţ polipeptidic). Formarea complexului factor tisular/VIIa la suprafaţa membranelor celulare determină mobilizarea factorului tisular din aparatul Golgi şi expunerea sa pe suprafaţa celulelor. Acest proces depinde de activitatea protează a factorului VIIa şi este un mecanism important de modulare a răspunsului la injuria vasculară, prin expunerea factorului tisular doar când şi unde este necesar.

Factorul IX (factorul Christmas) este o glicoproteină cu masă moleculară de 55.400 Da.

Activarea lui se produce de către factorul XIa, printr-un proces de proteoliză limitată. De asemenea, factorul IX poate fi activat şi de către factorul VII legat de factorul tisular (conexiune între calea intrinsecă şi cea extrinsecă, denumită calea extrinsecă alternativă). Prin intermediul punţilor de calciu, factorul IXa formează la nivelul suprafeţelor fosfolipidice complexe cu factorul VIII şi cu factorul X, pe care îl activează.

Factorul X (factorul Stuart-Prower) este o glicoproteină cu masa moleculară de 56.000 Da. Activarea sa se realizează prin proteoliză limitată şi este produsă fie prin acţiunea factorului IXa (cuplat într-un complex cu factorul VIII), fie prin acţiunea complexului factor VIIa-factor tisular. Factorul X se găseşte astfel la punctul de interferenţă a căii intrinseci şi a celei extrinseci. După activare, factorul X formează un complex cu factorul V, fosfolipidele şi ionii de calciu (complexul protrombinazei), activând proteolitic protrombina pe care o transformă în trombină.

Pacienţii hiperlipemici au nivele crescute ale factorului X, în timp ce la bolnavii cu insuficienţă hepatică se înregistrează nivele scăzute ale acestui factor.

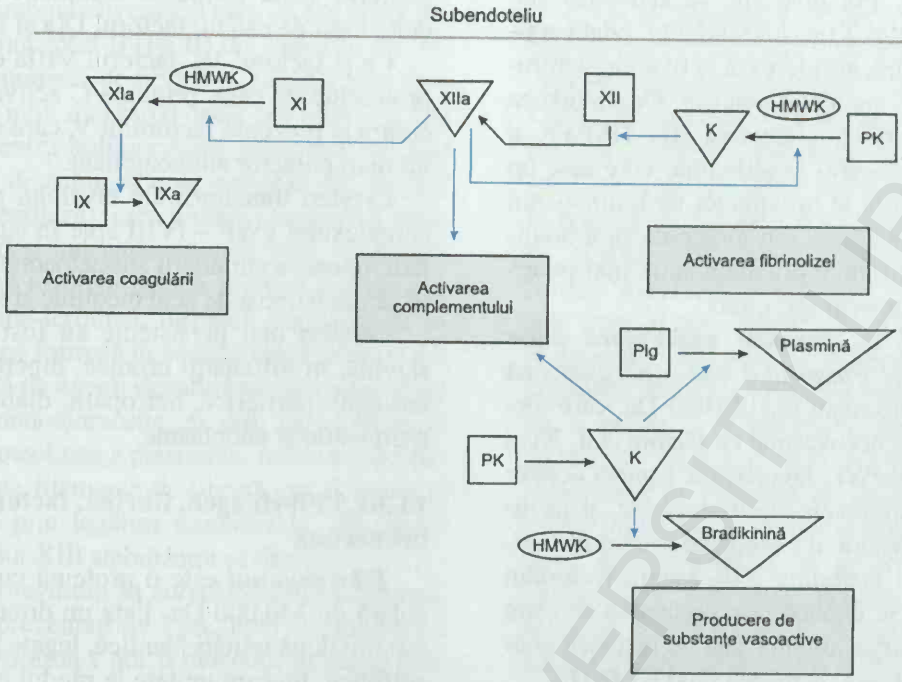


Figura 13.4. Factori care intervin în faza de activare prin contact
PK = prekalikreină; K = kalikreină; HMWK = kininogen cu greutate moleculară mare; Plg = plasminogen

13.3.1.3 Factori care intervin în faza de activare prin contact

Factorii implicaţi în faza de activare prin contact sunt factorii XII, XI, prekalikreina şi kininogenul cu greutate moleculară mare (HMWK). Primii trei sunt prezenţi în plasmă ca precursori ai unor serin proteaze şi se activează la contactul cu anumite suprafeţe, iar HMWK are rolul unui cofactor. Suprafeţele care declanşează activarea factorilor de contact sunt încărcate electronegativ. Printre acestea se numără sticla, caolinul, celita, acidul elagic, sulfatul de dextran. Au fost identificaţi şi activatori biologici ai acestor factori, printre care ARNul extracelular provenit din celulele lezate sau necrotice, membrana plachetelor sangvine stimulate cu ADP, membrana bazală, colagenul, cristalele de urați, endotoxinele bacteriene.

Această etapă a coagulării este în relaţie şi cu fibrinoliza; interacţiunea se reflectă în faptul că plasmina activează factorul XII, iar kininele rezultate sub acţiunea kalikreinei stimulează eliberarea de t-PA din endoteliile vasculare şi transformă plasminogenul în plasmină. În plus, faza de activare prin contact intervine şi în activarea sistemului renină-angiotensină, precum şi în activarea complementului, fiind astfel o importantă verigă de legătură între coagulare, fibrinoliză şi inflamaţie, aspecte reprezentate schematic în *Figura 13.4.*

Factorul XII *(factor Hageman)* este o proteină cu masa de circa 80.000 Da, care prin regiunea NH2-terminală se leagă de suprafeţele electronegative, în timp ce regiunea carboxi-terminală are activitate enzimatică. În activarea factorului XII intervin un proces de autoactivare spontană, precum şi interacţiunea sa cu factorul XI şi prekalikreina la nivelul suprafeţelor. Cantităţile reduse de factor XIIa formate activează prekalikreina la kalikreină şi factorul XI la factor XIa, care la rândul lor vor accelera activarea factorului XII. Factorul XII poate fi activat proteolitic şi de plasmină sau tripsină.

Factorul XI circulă în plasmă sub forma complexelor cu HMWK. Structural, este un homodimer cu o greutate de circa 160.000 Da. Sub acţiunea factorului XIIa, dar şi a tripsinei, factorul XI este activat prin clivare proteolitică, rezultând două lanţuri uşoare, care conţin centrul activ, şi două lanţuri grele prin care se leagă de HMWK. Factorul XIa determină activarea factorului IX pe calea intrinsecă.

Prekalikreina *(factorul Fletcher)* se găseşte în plasmă sub formă de zimogen, având masa moleculară 85.000 Da. Ea circulă în plasmă sub formă de complexe cu HMWK. Când sângele vine în contact cu o suprafaţă electronegativă, complexul este adsorbit la acest nivel împreună

cu factorul XII. Prekalikreina se activează sub acţiunea factorului XIIa. La rândul ei, odată activată, prekalikreina accelerează activarea factorului XII, aşa cum s-a arătat anterior. De asemenea kalikreina determină eliberarea din HMWK a unui peptid vasoactiv- bradikinina, care este un important mediator al inflamaţiei iar kininogenul rezultat după eliberarea din molecula sa a bradikininei are o activitate procoagulantă mai puternică decât precursorul său intact.

Kininogenul cu greutate moleculară mare *(HMWK, factorul Fitzgerald)* este o α2 globulină având masa moleculară de 120.000 Da, care formează complexe necovalente cu factorii XII, XI şi prekalikreina. HMWK favorizează legarea acestor complexe de suprafeţele electronegative, şi facilitează efectul activator al kalikreinei asupra factorului XII şi cel al factorului XIIa asupra factorului XI. Acest efect se explică prin protejarea de către HMWK a factorilor amintiţi faţă de acţiunea unor inhibitori de proteaze, în primul rând C1 INH.

13.3.1.4 Cofactori ai coagulării

Factorul V are o masă moleculară de 330.000 Da şi este sintetizat de ficat, dar şi de megakariocite, celule endoteliale şi celule musculare netede. Factorul V nu are activitate enzimatică, ci participă ca şi cofactor la activarea protrombinei de către factorul Xa. Urmele de trombină transformă factorul V într-o formă activată, fVa, care este capabil să se lege de fosfolipide şi care accelerează activarea protrombinei. Mecanismele prin care se produce acest proces constau în inducerea unor modificări conformaţionale ale moleculei de protrombină, facilitarea legării factorului Xa de suprafeţele fosfolipidice şi favorizarea formării complexului enzimă-substrat.

Factorul Va este degradat proteolitic de către proteina C activată. Prezenţa unei mutaţii punctiforme 1756A → G (Arg 506 → Gln), generează un factor V denumit factor V Leiden care este rezistent la inactivarea de către proteina C activată (APC), menţinându-şi însă activitatea procoagulantă.

Factorul VIII este o glicoproteină cu masă moleculară de aproximativ 330.000 Da, circulă în plasmă sub forma unui complex cu vWF, care îl transportă, îl stabilizează şi îl protejează faţă de acţiunea proteazelor. La apariţia unei leziuni vasculare, complexul vWF – factor VIII se fixează de structurile subendoteliale, iar urmele de trombină generate pe cale extrinsecă activează factorul VIII (similar cu activarea factorului V). Factorul VIIIa formează complexe cu fosfolipidele, ionii de calciu, factorul IXa şi factorul X.

Ca şi factorul Va, factorul VIIIa este degradat proteolitic de către proteina C activată, fiind necesară şi prezenţa factorului V, care aici joacă rolul unui cofactor anticoagulant.

Creşteri tranzitorii ale nivelului plasmatic ale complexului vWF – fVIII apar în cursul efortului fizic intens, a stimulării simpatoadrenergice şi după administrarea de acid nicotinic şi vasopresină.

Creşteri mai persistente au fost raportate în sarcină, în inflamaţii cronice, hipertiroidism, arteriopatii periferice, nefropatii, diabet zaharat cu retinopatie şi neoplasme.

13.3.1.5 Fibrinogen, fibrină, factor XIII, fibronectină

Fibrinogenul este o proteină cu masa moleculară de 340.000 Da. Este un dimer, fiind alcătuit din două unităţi identice, legate prin punţi disulfidice. Fiecare unitate la rândul ei este formată din trei lanţuri numite Aα, Bβ şi γ, astfel încât structura sa ar putea fi exprimată ca $A\alpha_2B\beta_2\gamma_2$.

Fibrinogenul este sintetizat în ficat, dar se găseşte şi în granulele α ale plachetelor, concentraţia sa plasmatică fiind de 200-400 mg/dL. Sinteza sa hepatică este stimulată de produşii de degradare ai fibrinogenului şi fibrinei, care acţionează indirect, prin stimularea macrofagelor care produc citokine (interleukinele 1 şi 6, TNF α). Aceste citokine induc sinteza hepatică a fibrinogenului alături de alte proteine de fază acută, ceea ce explică creşterea nivelului plasmatic de fibrinogen în acest context patologic. Scăderea cantităţii de fibrinogen se întâlneşte în faza iniţială a declanşării coagulării intravasculare diseminate (CID), în hepatopatiile aflate în stadiu terminal şi în deficitul genetic (situaţie rară).

Au fost descrise o serie de anomalii structurale ale fibrinogenului (disfibrinogenemii). Acestea se pot traduce prin polimerizarea modificată a fibrinogenului, care produce o fibrină rigidă, rezistentă la acţiunea plasminei (fibrinogen Chapell Hill III), prin eliberarea defectuoasă a peptidelor (fibrinogen Baltimore) sau printr-un mod particular de reacţie al reţelei de fibrină cu factorul XIII, care o face rezistentă la fibrinoliză (fibrinogen Marburg).

Transformarea fibrinogenului în fibrină decurge în mai multe etape. Într-o primă fază, trombina desprinde două fragmente peptidice numite fibrinopeptid A (FpA) din lanţurile Aα, proces care duce la formarea monomerilor de fibrină I.

Ulterior trombina clivează şi câte un fragment denumit fibrinopeptid B (Fp B) din lanţurile Bβ, rezultând monomerii de fibrină II. Îndepărtarea FpA se produce mult mai rapid decât cea a FpB şi este esenţială pentru polimerizarea monomerilor, fapt demonstrat de acţiunea unor proteaze din veninul de şarpe (reptilază), care produc coagularea fibrinogenului deşi îndepărtează doar FpA. Monomerii de fibrină rezultaţi agregă spontan şi polimerizează termino-terminal, formând filamente de fibrină. Fibrina formată în această etapă poate fi depolimerizată de agenţi denaturanţi cum sunt ureea şi acidul monocloracetic, şi este susceptibilă la acţiunea proteolitică a plasminei. Într-o etapă ulterioară, aceste filamente de fibrină vor fi legate şi consolidate prin legături transversale, sub acţiunea factorului XIII stabilizator al fibrinei.

Produşii rezultaţi în cursul coagulării fibrinogenului, reprezentaţi de FpA, FpB şi monomerii solubili de fibrină I pot fi detectaţi în sânge prin metode imunochimice şi constituie markeri ai activării coagulării in vivo. Astfel FpA are valori ridicate la pacienţi cu infarct miocardic, angină pectorală instabilă şi arteriopatii periferice.

Factorul XIII stabilizator al fibrinei este o proteină cu masa moleculară de 320.000 Da, fiind format din două subunităţi A şi două subunităţi B. Atât factorul XIII A cât şi factorul XIII B se găsesc sub formă dimerică (A2, respectiv B2), iar factorul XIII plasmatic constă din asocierea acestor subunităţi (f XIII A2B2).

Subunitatea B a factorului XIII este sintetizată în hepatocite, iar sinteza subunităţii A are loc în mai multe tipuri de celule, între care un loc principal îl ocupă monocitele şi megakariocitele (găsindu-se deci şi în plachetele sangvine). Subunitatea B asigură stabilitatea în plasmă a subunităţii A.

Activarea factorului XIII aflat în circulaţie sub formă inactivă, de zimogen, se produce sub acţiunea trombinei printr-o proteoliză limitată. Activarea decurge în două etape succesive, constând în clivarea unui fragment peptidic din subunităţile A şi apoi în disocierea subunităţilor A şi B, în urma cărora subunităţile A dobândesc o configuraţie activă, prin demascarea cisteinei din centrul activ al moleculei (F XIIIa*). Procesul de activare a F XIII sub acţiunea trombinei este stimulat de monomerii de fibrină care se formează din fibrinogen sub acţiunea trombinei. Prin polimerizarea acestor monomeri, ei formează un complex cu factorul XIII, care devine mai susceptibil la acţiunea trombinei.

Ca mod de acţiune, F XIII este o transglutaminază care în prezenţa ionilor de calciu consolidează reţeaua de fibrină prin stabilirea unor legături covalente transversale între resturi de glutamină şi lizină din monomeri diferiţi. De asemenea, sub acţiunea factorului XIII se încorporează în reţeaua de fibrină α2 antiplasmina, un inhibitor al plasminei. Aceste acţiuni conferă fibrinei calităţi mecanice superioare (cheag mai ferm, mai dens şi mai elastic) şi un oarecare grad de rezistenţă la fibrinoliză. Factorul XIII acţionează şi asupra altor substrate, printre care fibronectina, o proteină de adeziune pe care o leagă de reţeaua de fibrină şi de colagen. Acest efect are importanţă în procesul de vindecare a plăgilor, având însă şi un potenţial aterogen prin încorporarea microtrombilor în peretele vascular. De asemenea, f XIII poate acţiona şi asupra vitronectinei, o altă proteină de adeziune, precum şi asupra lipoproteinei (a), o proteină circulantă deosebit de aterogenă care prin acest mecanism se va fixa la nivelul depozitelor intravasculare de fibrină, contribuind la procesul de ateroscleroză.

În afară de rolul pe care îl joacă în hemostază, factorul XIII contribuie şi la procesul de vindecare a plăgilor, prin modularea interacţiunilor dintre fibrină, fibronectină, vitronectină şi matricea ţesutului conjunctiv. Interacţiunea acestor componente favorizează migrarea fibroblaştilor prin gelul de fibrină şi implicit formarea ţesutului conjunctiv.

Factorul XIII intervine şi în procesele de nidare a ovulului fecundat, rol sugerat de incapacitatea femeilor cu deficit homozigot de factor XIII de a duce la termen sarcina.

Fibronectina (FN)

Fibronectina face parte din grupul proteinelor de adeziune, alături de fibrinogen, vWF, vitronectină şi trombospondină. Aceste proteine au ca element comun prezenţa în structura lor primară a unui tripeptid Arg-Gly-Asp, care este recunoscut de receptori celulari specifici, denumiţi integrine. Fibronectina este sintetizată de hepatocite, de celulele endoteliale, fibroblaşti şi macrofage. Ea este prezentă în matricea substanţei fundamentale a ţesutului conjunctiv, unde se leagă de fibrele de colagen. Există şi o formă solubilă, circulantă a fibronectinei. Sub acţiunea factorului XIII, fibrina se leagă de fibronectină, şi prin intermediul acesteia, de colagen, ceea ce asigură procesul de reparare tisulară dar favorizează şi încorporarea microtrombilor în peretele arterial, contribuind al ateroscleroză.

În afară de hemostază, prin acţiunea sa opsonizantă fibronectina intervine şi în procesele de fagocitoză a germenilor microbieni şi a detritusurilor celulare.

Nivele scăzute de fibronectină au fost semnalate după intervenţii chirurgicale ample, traumatisme, arsuri extinse şi în CID, mecanismele fiind complexe (consum în microtrombi, antrenarea FN în zonele lezate în vederea reparării tisulare, scăderea sintezei hepatice).

Creşteri ale fibronectinei au fost descrise la obezi, la subiecţi cu hiperlipoproteinemie tip IIb şi IV şi la pacienţi cu sindrom nefrotic, explicaţia fiind accelerarea sintezei de proteine în ficat.

13.3.2 Explorarea coagulării

Corectitudinea rezultatelor testelor de coagulare depinde de respectarea unor reguli legate de recoltarea probelor. Astfel, garoul trebuie menţinut un timp cât mai scurt posibil, recoltarea se va face în tuburi de plastic sau sticlă siliconată (pentru a evita activarea factorilor de contact), cu respectarea proporţiei corecte între sânge şi anticoagulant, iar proba se va trimite la laborator în interval de maximum 2 ore (respectiv 1 oră la pacienţii trataţi cu heparină).

13.3.2.1 Timpul Quick (TQ, timpul de protrombină, PT)

Reprezintă timpul de coagulare al plasmei după adăugarea de tromboplastină celulară şi calciu. Acest test explorează calea extrinsecă a coagulării, depinzând deci de factorii VII, V, X şi II. Exprimarea timpului de protrombină se face:

- în secunde, comparând plasma de bolnav cu o plasmă martor
- ca procent faţă de o plasmă martor (indice de protrombină, IP), ale cărui valori normale sunt 70 –110%
- ca INR (*International Normalized Ratio*) care reprezintă (TQ bolnav/TQ martor)^{ISI}, unde ISI (*International Sensitivity Index*) reprezintă o caracteristică a tromboplastinei utilizate. Valorile normale ale INR sunt de 0,9-1,1. Acest mod de exprimare este de preferat, deoarece înlătură diferenţele date de folosirea diferitelor tipuri de tromboplastină şi permite o bună monitorizare a pacienţilor trataţi cu antivitamine K (AVK).

Timpul de protrombină este prelungit în tratamentul cu AVK, în insuficienţa hepatică, în caz de existenţă a unor anticoagulanţi circulanţi dirijaţi împotriva factorilor investigaţi, sau în caz de deficit genetic al factorilor implicaţi.

13.3.2.2 Testul Owren

Se practică utilizând plasmă diluată de 10 ori, la care se adaugă fibrinogen şi factor V (Normotest) sau fibrinogen, factor V şi factor VIII (Thrombotest), urmat de adăugarea de tromboplastină calcică. Semnificaţia exploratorie este aceeaşi ca şi a timpului Quick, testul fiind însă mai sensibil la modificările factorilor II, VII şi X care apar în cursul terapiei cu AVK. Acest test nu se utilizează în practica de rutină.

O variantă a timpului Quick este testul EXCA (*Extrinsic Coagulation Activity Assay*), un test cromogenic global, care constă în incubarea plasmei cu tromboplastină calcică, urmată de oprirea generării trombinei, apoi de o etapă de detecţie a trombinei cu ajutorul unui substrat cromogen. Testul se utilizaează la pacienţii trataţi cu anticoagulante dirijate împotriva factorului Xa (heparine fracţionate) sau trombinei (Hirudin).

13.3.2.3 Testul Stypven este un test în care sub acţiunea veninului de Vipera Russelli se iniţiază coagularea direct prin activarea factorului X în prezenţa de fosfolipide. Acest test va fi prelungit în deficitele factorilor V, X, II sau fibrinogen şi normal în deficitul izolat de factor VII.

13.3.2.4 Timpul de tromboplastină parţial activată (APTT)

Acest test explorează calea intrinsecă şi comună şi constă în incubarea plasmei cu un reactiv care conţine fosfolipide (cefalină) şi un activator al factorilor de contact (caolin, acid elagic), măsurându-se timpul de apariţie a cheagului după adăugarea de $CaCl_2$. Valoarea se exprimă în raport cu o plasmă martor şi variază în funcţie de reactivii folosiţi, fiind de ordinul a 25-50 de secunde. Raportul între APTT la pacient şi la martor trebuie să fie sub 1,2. APTT este prelungit în tratamentul cu heparine nefracţionate, în deficitele factorilor de pe calea intrinsecă şi comună (cele mai frecvente fiind deficitele de factor VIII şi factor IX), sau în cazul existenţei unor anticoagulanţi circulanţi sau anticorpi antifosfolipide.

Un test recent care explorează global calea intrinsecă este INCA (Intrinsic Coagulation Activity Assay), constând în incubarea plasmei cu particule de SiO_2 şi $CaCl_2$. După stoparea reacţiei se măsoară activitatea trombinei cu ajutorul unui substrat cromogen.

13.3.2.5 Timpul de trombină(TT)

Explorează etapa fibrinoformării şi reprezintă timpul de coagulare al plasmei la care s-a adăugat trombină. Valoarea normală este de 18-20 de secunde. Prelungirea timpului de trombină apare la pacienţii trataţi cu heparină, în cazul prezenţei produşilor de degradare a fibrinei, în caz de hipofibrinogenemii sub 50 mg/dL sau disfibrinogenemii.

13.3.2.6 Timpul de reptilază este o variantă a timpului de trombină în care trombina (sensibilă la acţiunea heparinei) este înlocuită cu reptilază, o enzimă sensibilă doar la prezenţa produşilor de degradare a fibrinei.

13.3.2.7 Dozarea fibrinogenului se face în mod uzual prin evaluarea vitezei de coagulare a plasmei (dependentă de cantitatea de fibrinogen) sub acţiunea trombinei. Există şi alte metode de dozare, acestea fiind gravimetrice, turbidimetrice sau imunologice.

13.3.2.8 Teste specifice pentru factorii coagulării

- *Dozarea factorului XIII* se face prin dozarea NH_3 eliberat prin acţiunea f XIII (transglutaminază), sau urmărind fluorometric capacitatea factorului XIII de a încorpora o amină fluorescentă în cazeină. Depistarea rapidă a unui deficit de factor XIII se poate face prin demonstrarea solubilităţii cheagului obţinut prin coagularea plasmei într-o soluţie de uree 5 M.
- *Ceilalţi factori ai coagulării* se pot doza individual (în general la pacienţii suspectaţi de deficite izolate ale unuia dintre factori) prin utilizarea unor plasme substrat lipsite de factorul respectiv. Prin amestecarea plasmei deficitare în factorul de dozat cu plasma de pacient (suspectat de deficit) şi efectuarea din acest amestec a PT sau APTT (în funcţie de poziţia factorului de dozat în cascada coagulării) se urmăreşte în ce măsură plasma de pacient corectează plasma substrat deficitară. Cu cât deficitul la pacient este mai sever, cu atât corectarea plasmei substrat va fi mai slabă. Gradul de corectare se compară cu cel al unor diluţii de plasmă martor.

13.3.3Patologia coagulării

13.3.3.1 Anomalii cu caracter dobândit

În numeroase afecţiuni apar modificări ale nivelului plasmatic al diferiţilor factori ai coagulării, de obicei acestea fiind însoţite şi de modificări ale sistemului fibrinolitic şi uneori de anomalii cantitative sau funcţionale plachetare. Din aceste considerente am socotit mai oportun să prezentăm aceste modificări dobândite ale hemostazei într-un subcapitol separat.

13.3.3.2 Anomalii cu caracter genetic

Aceste deficite sunt relativ rare, de exemplu hemofilia A apare cu o frecvenţă de 1:10.000, iar hemofilia B cu o frecvenţă de 1:50.000, celelalte anomalii fiind mult mai rar întâlnite. Chiar dacă sunt puţin frecvente, aceste anomalii au adus o contribuţie importantă la înţelegerea rolului jucat de diferiţii factori ai coagulării în procesul de hemostază.

Deficitul de factor VIII (hemofilia A)

Este cea mai frecventă anomalie genetică a coagulării şi se transmite legat de cromozomul X, pe care se află localizată gena pentru factor VIII. Există mai multe mutaţii care produc hemofilia, dintre care formarea unor molecule incomplete de f VIII prin intervenţia unui codon stop, sau anomalii funcţionale ale f VIII, care însă este prezent ca antigen. La femei, cromozomul X indemn va compensa deficitul produs de mutaţie, manifestările hemoragice fiind absente. În schimb, la băieţii care moştenesc cromozomul X matern afectat de mutaţie, efectele acesteia nu sunt compensate, apărând sindromul hemoragipar. De precizat că spre deosebire de hemofilie, boala von Willebrand se transmite prin mecanism autosomal, putându-se manifesta clinic şi la femei.

Manifestările clinice depind de severitatea deficitului. În deficitele severe apar hemartroze, hematoame subcutanate, intramusculare, sângerări după traumatisme minime sau intervenţii chirurgicale minore şi epistaxis.

Diagnosticul de laborator se bazează pe prelungirea APTT neînsoţită de modificări ale altor teste de coagulare, precum şi pe determinarea activităţii factorului VIII. Principala problemă de diagnostic diferenţial o constituie boala von Willebrand (tip I), în care pe lângă prelungirea APTT se constată şi un timp de sângerare prelungit, iar nivelul vWF este scăzut. Diagnosticul poate fi completat de investigaţii de biologie moleculară, care sunt utile mai ales pentru detectarea femeilor purtătoare.

Deficitul de factor IX (hemofilia B)

Este de 5-10 ori mai puţin frecventă decât hemofilia A şi este cauzată de un deficit de factor IX. Ca şi la hemofilia A, gena responsabilă este localizată pe cromozomul X, iar anomalia se datorează fie unui deficit cantitativ de sinteză, fie sintezei unor molecule nefuncţionale de factor IX.

Manifestările clinice sunt asemănătoare cu cele din hemofilia A, însă formele severe sunt mult mai rare.

Afibrinogenemia, disfibrinogenemiile

Afibrinogenemia este o anomalie rară (1: 2 milioane locuitori) cu transmitere autosomal recesivă. Manifestările clinice la homozigoți constau în hemoragii din cordonul ombilical, epistaxis, gingivoragii, menoragii, hematoame, sângerări prelungite din plăgi şi întârzieri în procesul de cicatrizare (datorită absenței fibrinei). În deficitele severe, examinările de laborator relevă o absență a fibrinogenului, iar sângele este practic incoagulabil, fiind prelungiți şi PT, APTT şi timpul de trombină. De asemenea lipsa fibrinogenului diminuă agregabilitatea plachetară, iar timpul de sângerare este prelungit.

Disfibrinogenemiile reprezintă anomalii calitative ale moleculei de fibrinogen, fiind descrise până acum circa 37 de asemenea mutații. Manifestările clinice în disfibrinogenemii sunt puțin exprimate. Unele dintre aceste anomalii evoluează cu manifestări hemoragice (sângerări prelungite după intervenții chirurgicale, menoragii, sângerări din placentă în timpul sarcinii) şi cu vindecarea întârziată a plăgilor. Există şi unele disfibrinogenemii caracterizate prin tendința la tromboză. Examinările de laborator evidențiază o discordanță între timpul de trombină care este foarte prelungit şi PT şi APTT, care sunt normale. În cazurile cu deficit sever şi aceste teste sunt prelungite.

Deficitul de protrombină este anomalia cel mai rar întâlnită (35 de cazuri). Manifestările hemoragice constau în sângerări din cordonul ombilical, hemoragii ale mucoaselor şi din plăgi cu ocazia intervențiilor chirurgicale. Testele de laborator arată o prelungire a timpului de protrombină şi a APTT.

Deficitul de factor V se traduce prin prelungirea timpului de trombină şi a APTT, diagnosticul de certitudine fiind dat de incapacitatea plasmei de pacient de a corecta coagulabilitatea unei plasme lipsite de factor V. Manifestările hemoragice nu sunt deosebit de exprimate în cazul acestei anomalii.

Defictul de factor VII se manifestă printr-un sindrom hemoragic nu foarte sever, iar testele de laborator evidențiază prelungirea timpului de protrombină, APTT şi timpul de trombină fiind nemodificați. Confirmarea deficitului se face prin demonstrarea lipsei de corectare a coagulabilității unei plasme lipsite de factorul VII.

Defictul de factor X este rar întâlnit (similar cu cel de protrombină) şi se traduce prin prelungirea PT şi APTT. Caracteristică este prelungirea importantă a testului Stypven, iar dozarea se face utilizând plasmă deficitară în factor X.

Deficitul de factor XI evoluează cu un sindrom hemoragic relativ blând, iar testele de laborator evidențiază o prelungire a APTT, în timp ce PT este normal. Precizarea diagnosticului se face cu ajutorul plasmei lipsite de factor XI.

Deficitul de factor XII este o anomalie care interesează etapa inițială a activării prin contact şi care din punct de vedere al testelor de laborator se manifestă prin prelungirea APTT. Diagnosticul de certitudine se pune utilizând o plasmă deficitară în factor XII. Aceşti subiecți nu prezintă sindrom hemoragic, ci, dimpotrivă, uneori pot avea manifestări trombotice. Aceasta s-ar putea explica prin contribuția pe care o are factorul XII ca activator al fibrinolizei, deficitul său ducând la o fibrinoliză mai încetinită.

Deficitul de factor XIII are drept consecință formarea unei rețele de fibrină mai laxe, cu calități mecanice mai precare şi mai susceptibilă la fibrinoliză. Clinic apar manifestări hemoragice destul de importante. Acestea constau în hematoame cutanate, intramusculare, cerebrale, hemartroze, hemoragii intraperitoneale la femei. Pacienții mai prezintă o vindecare întârziată a plăgilor, iar femeile pot prezenta avorturi spontane repetate. Bărbații cu deficit homozigot pot prezenta oligospermie sau azoospermie.

13.4 Mecanisme anticoagulante fiziologice

Limitarea formării de trombi la regiunea unde s-a produs o leziune vasculară este realizată printr-o multitudine de mecanisme care previn extinderea depozitelor fibrinoplachetare. Acestea sunt reprezentate de proprietățile antitrombotice ale endoteliilor intacte, de efectul de îndepărtare a factorilor activați ai coagulării de către torentul circulator, de intervenția sistemului fibrinolitic precum şi de existența unor mecanisme anticoagulante specifice. Deficitele genetice sau dobândite ale acestor mecanisme anticoagulante predispun la apariția trombozelor.

13.4.1 Antitrombina III (AT III)

Este o α2 glicoproteină plasmatică sintetizată de ficat şi de endoteliile vasculare. AT III face parte din familia inhibitorilor de serinproteaze (superfamilia SERPIN), alături de α1 antitripsină, α2 macroglobulină, α2-antiplasmină, PAI şi C1 inhibitor. Acțiunea inhibitorie a AT III se exercită în principal asupra trombinei, dar şi a factorilor Xa şi IXa. Într-o mult mai mică măsură AT III inhibă acțiunea factorilor XIIa şi XIa, kalikreina şi plasmina (*Figura 13.5*).

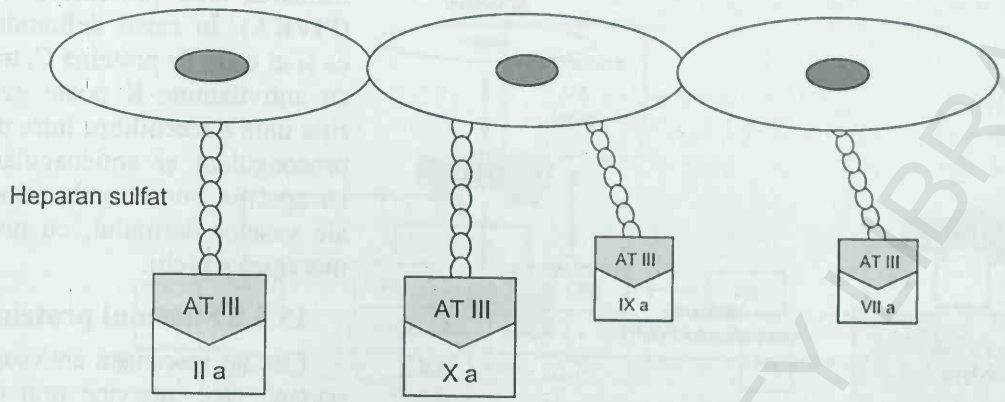


Figura 13.5. Mecanismul de acţiune al antitrombinei III

Activitatea antitrombinei este accelerată de aproximativ 1000 de ori în prezenţa heparinei, respectiv a heparansulfatului endotelial, datorită unor modificări conformaţionale induse moleculei de AT III de către aceste substanţe care îi cresc afinitatea faţă de serinproteaze.

Metodele de explorare în laborator a AT III sunt fie metode imunologice (acestea detectează antigenul AT III dar nu furnizează informaţii despre funcţia acesteia) şi metode funcţionale, bazate pe proprietatea AT III de a inhiba trombina, acestea putând fi efectuate în prezenţa sau în absenţa heparinei.

Deficitele genetice de antitrombină III se transmit autosomal dominant cu penetranţă variabilă şi sunt responsabile de 4-6% din trombozele venoase familiale. Trombozele apar în majoritatea cazurilor în legătură cu sarcina, avortul, naşterea, consumul de contraceptive orale, intervenţii chirurgicale, supraponderea.

Există două tipuri majore ale deficitului genetic de AT III:

Tipul I – cantitativ se caracterizează prin scăderea simultană a antigenului şi a funcţiei şi se datorează sintezei deficitare a unor molecule normale de AT III. Deficitul homozigot de tip I este incompatibil cu viaţa.

Tipul II – calitativ, se caracterizează prin nivele normale ale antigenului şi reducerea activităţii AT III şi se datorează unor mutaţii punctiforme care perturbă funcţia moleculei de AT III. O sistematizare a acestor disfuncţii moleculare le clasifică în:

- Tipul II RS (*reactive site*) în care mutaţiile interesează situsul prin care AT III se leagă de trombină.
- Tipul II HBS (*heparin binding site*) caracterizat prin perturbarea legării antitrombinei de heparină. Plasma acestor pacienţi inhibă lent trombina şi factorul Xa dar nu îşi accelerează efectul în prezenţa heparinei.
- Tipul II PE (*pleiotropic effects*) în care mutaţiile exercită efecte multiple (pleiotrope) atât asupra situsului reactiv cât şi asupra situsului de legare al heparinei. În unele cazuri mutaţiile generează o moleculă de antitrombină susceptibilă la o degradare precoce în circulaţie, rezultând astfel o scăderea atât a antigenului cât şi a funcţiei (ceea ce pune probleme de diagnostic diferenţial cu deficitul cantitativ de tip I; elucidarea se face prin tehnici de biologie moleculară).

Deficite dobândite ale antitrombinei III apar în ciroza hepatică (prin sinteza deficitară), în sindromul nefrotic şi enteropatia exsudativă (datorită pierderilor renale, respectiv intestinale) şi în CID (prin consum). Creşteri ale nivelelor de AT III se înregistrează în cadrul reacţiei de fază acută.

13.4.2 Cofactorul II al heparinei (HC II)

HC II este un inhibitor de serin proteaze care are o structură similară antitrombinei. Efectul său inhibitor se exercită însă doar asupra trombinei, iar acţiunea sa anticoagulantă este potenţată de heparină şi de legarea de dermatansulfatul endotelial.

Deficitul genetic de HC II este asociat cu apariţia evenimentelor trombotice, având o pondere redusă (0,6%) din cauzele genetice de tromboze venoase. Prevalenţa similară a deficitului la subiecţi cu tromboze repetitive şi la subiecţi sănătoşi pune problema dacă deficitul de HC II este în sine un factor de risc important pentru tromboză.

Deficite dobândite le HC II s-au înregistrat la pacienţii cu coagulare intravasculară diseminată şi la cei cu insuficienţă hepatică.

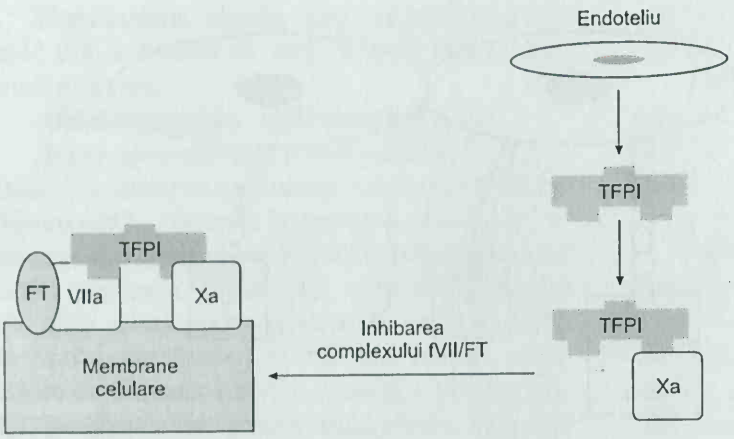


Figura 13.6. Mecanismul de acţiune al inhibitorului căii mediate de factorul tisular (TFPI)

13.4.3 Inhibitorul căii mediate de factorul tisular (TFPI) sau inhibitorul căii extrinseci (EPI)

TFPI este sintetizat de endoteliile vasculare, de care rămâne fixat prin intermediul unor glucozaminoglicani. TFPI devine activ doar după iniţierea coagulării, respectiv după generarea factorului Xa. Acesta odată format se leagă de TFPI, iar acest complex inhibă complexul format de factorul VIIa cu factorul tisular (*Figura 13.6*). Cu alte cuvinte, coagularea extrinsecă se autolimitează prin intermediul acestui mecanism.

13.4.4 Proteina Z (PZ) şi inhibitorul proteinei Z (PZI)

Proteina Z este o glicoproteină plasmatică dependentă de vitamina K, care în prezenţa fosfolipidelor şi a ionilor de calciu formează un complex cu factorul Xa, servind drept cofactor pentru inactivarea rapidă a factorului Xa de către inhibitorul proteinei Z, un inhibitor de proteaze.

Studii experimentale şi cercetări clinice sugerează o asociere între deficitul de proteină Z şi creşterea riscului trombotic la unele categorii de pacienţi (pacienţi tineri cu accidente vasculare cerebrale care nu au alţi factori de risc pentru ateroscleroză şi pacienţi cu trombembolism venos cu mutaţie Leiden a factorului V). Deficitul de proteină Z a fost descris la pacienţi cu accidente vasculare cerebrale, sindroame coronariene acute, la gravide cu evoluţie nefavorabilă a sarcinii şi în sindromul nefrotic.

Un aspect cu importanţă practică este reprezentat de tratamentul cu anticoagulante orale, care interferă cu acţiunea vitaminei K, generând formarea unor proteine nefuncţionale (PIVKA). În cazul deficitului de PZ, ca şi al celui de proteină C, tratamentul cu antivitamine K poate genera apariţia unui dezechilibru între potenţialul procoagulant şi anticoagulant, soldat cu apariţia microtrombozelor venoase ale vaselor dermului, cu necroza hemoragică a pielii.

13.4.5 Sistemul proteinei C

Este un mecanism anticoagulant important, care intervine prin degradarea factorilor Va şi VIIIa şi este format din proteina C, cofactorul ei proteina S, trombomodulina şi receptorul endotelial al proteinei C (EPCR, *Endothelial Protein C Receptor*).

Proteina C (PC) este o serinprotează dependentă de vitamina K sintetizată în ficat, sub formă de zimogen. PC este activată de către trombina legată de o glicoproteină endotelială numită ***trombomodulină. Receptorul endotelial al proteinei C (EPCR)*** este o proteină transmembranară care leagă atât proteina C cât şi proteina C activată (APC) şi care reglează acest sistem anticoagulant prin accelerarea activării proteinei C de către complexul trombină-trombomodulină. A fost identificată şi o formă circulantă solubilă a EPCR (s-EPCR) a cărui legare de APC blochează interacţiunea cu fosfolipidele şi inhibă centrul activ al APC, perturbând astfel acţiunea APC asupra factorului Va.

Proteina S (PS), de asemenea dependentă de vitamina K este sintetizată de ficat dar şi de plachetele sangvine şi de endotelii. Rolul său de cofactor al proteinei C se exercită prin formarea unor complexe între proteina C activată şi suprafeţele fosfolipidice electronegative. Aproximativ 40% din PS circulă în plasmă sub formă liberă şi intervine în procesul amintit mai sus, restul de 60% circulă legată de o proteină care transportă şi fracţiunea C4b a complementului, denumită C4b-BP (*C4b Binding Protein*) şi este nefuncţională din punct de vedere al acţiunii de cofactor anticoagulant.

Proteina C odată activată, în prezenţa cofactorului ei proteina S şi a ionilor de calciu degradează proteolitic factorii VIIIa şi Va ai coagulării, la nivelul suprafeţelor fosfolipidice, exercitând astfel un efect anticoagulant (*Figura 13.7*). Degradarea factorului VIIIa de către APC necesită şi prezenţa factorului V intact, care în această situaţie are un rol

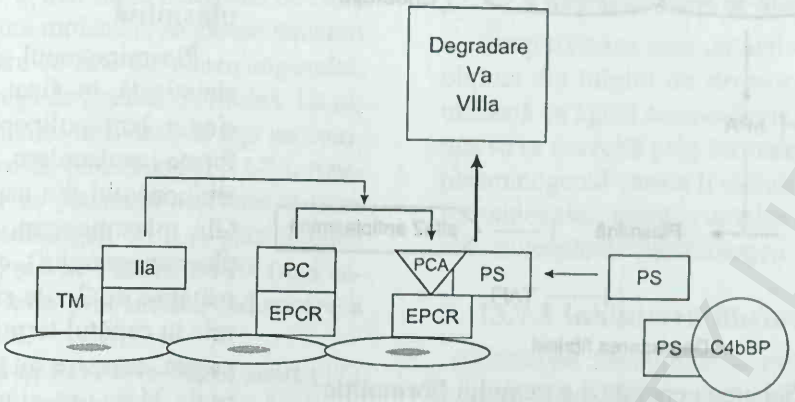


Figura 13.7. Sistemul proteinei C

PC = proteina C; PCA = proteina C activată; PS = proteina S; EPCR= receptorul endotelial al proteinei C; TM= trombomodulină; C4bBP = proteina care leagă fracţiunea C4b a complementului

de cofactor anticoagulant. PC activată are şi o acţiune profibrinolitică prin neutralizarea efectului inhibitor al PAI. Cele două tipuri de efecte fac din acest sistem un important mecanism antitrombotic.

În afară de proprietăţile sale anticoagulante şi profibrinolitice, proteina C activată are şi efecte antiinflamatorii şi antiapoptotice, care se manifestă atunci când proteina C activată se leagă de EPCR şi clivează proteolitic un receptor denumit receptor activat de proteaze 1 (PAR-1).

Dozarea proteinei C se poate face ca antigen (prin teste ELISA) sau prin teste funcţionale coagulometrice sau amidolitice. Testele ELISA pentru dozarea proteinei S pot detecta fie nivelul total de PS, fie doar fracţiunea ei liberă care intervine ca şi cofactor al PC. PS poate fi dozată şi funcţional prin metode coagulometrice.

Deficitele genetice de PC şi PS reprezintă o cauză importantă de tromboze venoase, apariţia acestora având aceiaşi factori precipitanţi care au fost enumeraţi în cazul deficitului de AT III.

Deficitul de proteină C de tip I constă în reducerea concomitentă a antigenului şi activităţii, iar cel de tip 2 se caracterizează prin scăderea activităţii, nivelul antigenului fiind normal. Mutaţiile afectând PC pot interesa centrul activ, pot perturba interacţiunea PC cu cofactorul ei PS sau legarea PC de EPCR. A fost descris şi un deficit al receptorului endotelial pentru proteina C (EPCR), care se soldează cu incapacitatea de generare a proteinei C activate şi cu predispoziţie la tromboze.

Un aspect important pentru practică este tratamentul intempestiv cu anticoagulante orale la pacienţi cu deficit heterozigot de proteină C, care poate produce necroza hemoragică a pielii prin tromboza vaselor dermului. Fenomenul se explică prin scăderea rapidă (T/2 6-8 ore) a formelor funcţionale, activabile ale PC în raport cu factorii coagulării dependenţi de vitamina K, care scad mai lent (în special protrombina cu T/2 de 60 de ore).

Se descriu 3 tipuri de deficit de proteină S. Tipul 1 se caracterizează prin nivele reduse ale antigenului şi activităţii PS. În tipul 2 nivelul antigenului este normal, în timp ce activitatea este scăzută. În tipul 3 proteina S totală are nivele normale, dar proteina S liberă este redusă, datorită unei mutaţii care creşte afinitatea şi legarea proteinei S de C4b BP. Deficitul homozigot de proteină S este asociat cu purpura fulminans neonatală.

O anomalie vasculară constând în îngustarea progresivă a arterelor cerebrale şi denumită sindromul moyamoya a fost asociată cu deficitul genetic combinat al proteinelor C şi S.

Deficite cu caracter dobândit ale PC şi PS se descriu în legătură cu scăderea sintezei (insuficienţă hepatică) sau cu consumul crescut în CID.

De menţionat că în sindromul nefrotic proteina C nu se pierde, ci are chiar nivele plasmatice crescute, datorită încărcăturii ei electronegative care face să fie respinsă la nivelul capsulei Bowmann. PS are nivele antigenice totale crescute (prin acelaşi mecanism), având însă o funcţionalitate redusă, probabil prin creşterea procentului de PS legată de C4b BP şi diminuarea fracţiunii libere.

Rezistenţa la proteina C activată (APC). Factorul V Leiden

Defectul molecular responsabil de această anomalie este o mutaţie punctiformă a factorului V, 1756A → G (Arg 506 → Gln), care face ca acesta să îşi păstreze activitatea procoagulantă, fiind însă rezistent la inactivarea de către APC. Rezistenţa la APC se produce atât prin pierderea unui situs de

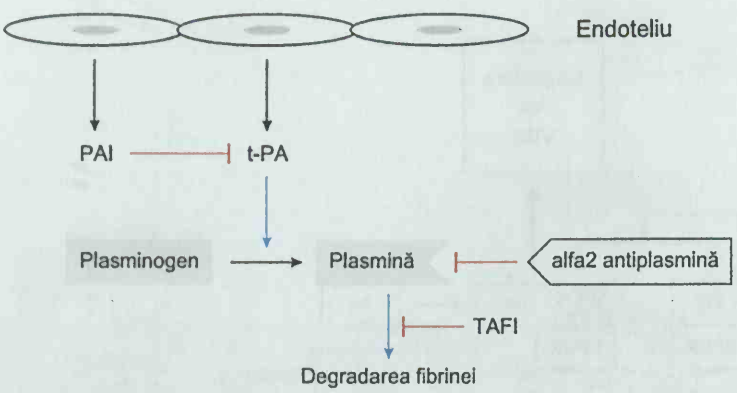


Figura 13.8. Schema generală a sistemului fibrinolitic
PAI = inhibitorul activatorului plasminogenului; t-PA = activator tisular al plasminogenului; TAFI = inhibitorul fibrinolizei activabil de către trombină

inactivare de către factorul Va, cât şi prin pierderea activităţii de cofactor a factorului V în procesul de inactivare a factorului VIII de către APC.

Ca semnificaţie clinică, rezistenţa la APC este socotită drept cea mai frecventă cauză de tromboze ereditare. Anomalia are o penetranţă incompletă, în funcţie de factorii de mediu şi de influenţa altor gene, fapt sugerat de exprimarea fenotipică diversă a mutaţiei (există homozigoţi asimptomatici şi heterozigoţi cu manifestări clinice).

Detectarea rezistenţei la APC se face prin evaluarea prelungirii APTT-ului plasmei de analizat la adăugarea de APC. În cazul rezistenţei la APC, adăugarea de APC nu prelungeşte semnificativ APTT. Pentru a elimina posibila rezistenţă dată de nivelul crescut al factorului V, plasma de analizat se diluează cu o plasmă lipsită de factor V. Mutaţia Leiden trebuie confirmată ulterior prin teste de biologie moleculară.

13.4.6 Anexina A-5

Este o proteină cu proprietăţi anticoagulante, cu o masă de 34.000 D, care a fost iniţial izolată din placentă. În momentul activării plachetare anexina se leagă în prezenţa ionilor de calciu de fosfolipidele electronegative expuse pe suprafaţa plachetelor (fosfatidilserină), inhibând legarea factorilor coagulării (factorul X şi trombina) de aceste suprafeţe.

13.7 Fibrinoliza

Fibrinoliza reprezintă ansamblul proceselor care asigură îndepărtarea depozitelor de fibrină (care ar putea genera tromboze), prevenind totodată liza prematură a cheagului, care ar antrena hemoragii. Asigurarea acestui echilibru delicat este realizată prin interacţiuni complexe între componentele activatoare şi inhibitoare ale sistemului fibrinolitic (*Figura 13.8*).

13.7.1 Plasminogenul şi plasmina

Plasminogenul este o glicoproteină sintetizată în ficat, formată dintr-un singur lanţ polipeptidic. Există două forme moleculare, care diferă prin aminoacidul din capătul N - terminal: Glu plasminogen, (forma nativă a plasminogenului), cu un timp de înjumătăţire de 2 zile şi având acid glutamic în capătul terminal, şi Lys plasminogen, care are un timp de înjumătăţire de 24 de ore, şi provine din clivarea Glu plasminogenului în cursul activării fibrinolizei, prezentând lizină în capătul N - terminal.

Molecula de plasminogen prezintă 5 anse (kringles), care au o afinitate înaltă pentru legarea de lizină şi compuşi analogi, motiv pentru care se numesc *lysin binding sites* – LBS. Aceste structuri permit legarea plasminogenului în reţeaua de fibrină, precum şi interacţiunea sa cu α2 antiplasmina. Lipoproteina (a) prezentă la 10-20% din subiecţii normo şi hiperlipemici are ataşată o apoproteină particulară - apo (a), care are o porţiune din moleculă similară structural cu situsurile prin care plasminogenul se leagă de fibrină. Lipoproteina (a) are o mare afinitate pentru fibrină, fibronectină şi proteoglicani, intrând în competiţie cu plasminogenul pentru legarea în reţeaua de fibrină şi având un efect de inhibare a fibrinolizei.

Plasmina este o enzimă proteolitică ce se formează din precursorul ei inactiv – plasminogenul. Plasmina degradează proteolitic fibrina, fibrinogenul, dar şi alte proteine plasmatice, mai ales factorii V şi VIII ai coagulării, având predilecţie pentru legăturile peptidice Arg-Lys (proprietate ce permite utilizarea unor substrate sintetice pentru determinarea activităţii plasminei).

13.7.2 Activatorii fibrinolizei

13.7.2.1 Activatorul tisular al plasminogenului

Activatorul tisular al plasminogenului (t-PA) este sintetizat şi stocat de celulele endoteliale, fiind eliberat sub efectul unor stimuli ca hipoxia generalizată sau localizată, acidoza, efortul fizic, adrenalina, vasopresina, acidul nicotinic.

t-PA nativ se găseşte sub formă monocatenară (*single chain t-PA*, sc-t-PA) şi sub acţiunea plasminei şi a tripsinei se transformă într-o moleculă cu 2 lanţuri polipeptidice (*two chain t-PA,* tc-t-PA), care

este mai activă, dar şi mai rapid inactivată de către inhibitori. În structura moleculei se găsesc structuri în ansă asemănătoare cu cele ale plasminogenului, prin care t-PA se leagă de reţeaua de fibrină. La nivelul reţelei de fibrină se formează de fapt un complex ternar între aceasta, plasminogen şi t-PA. Apariţia primelor urme de plasmină accelerează transformarea Glu-plasminogen în Lys-plasminogen (mai uşor activabil) şi a sc-t-PA în tc-t-PA (mai activ). Fibrina însăşi este prin urmare inductoare a activităţii fibrinolitice.

Timpul de viaţă al t-PA este foarte scurt (T/2 de 5 minute), fiind captat şi inactivat în ficat. Doar circa 5% din t-PA circulant se găseşte sub formă liberă, activă, restul fiind complexat cu inhibitorul său PAI.

13.7.2.2 Activatorul de tip urinar al plasminogenului (urokinaza, u-PA)

Urokinaza este sintetizată de celulele epiteliale renale, ale căilor urinare, vaginale, corneene, din mucoasa gastrică, macrofage şi celule endoteliale. Ea a fost evidenţiată în plasmă, urină, lichid seminal şi colostru.

u-pA este o enzimă proteolitică sintetizată iniţial ca proenzimă (prourokinază, sc-u-PA), care se transformă în forma activă tc-u-PA.

u-PA intervine în menţinerea permeabilităţii ductelor excretoare, prin îndepărtarea depozitelor fibrinoase, dar intervine alături de t-PA şi în activitatea fibrinolitică generală. Pe suprafaţa unor celule cum ar fi fibroblaştii, monocitele, granulocitele, spermatozoizii, celulelele endoteliale au fost evidenţiaţi receptori pentr u-PA. Asemenea receptori se găsesc şi pe celulele tumorale din carcinoame mamare, ale colonului, limfoame histiocitare, ceea ce favorizează focalizarea activităţii fibrinolitice pe respectivele celule şi implicit potenţialul metastazant al acestor tumori.

13.7.2.3 Sistemul de activare intrinsec

Este reprezentat de către factorul XII, prekalikreină şi HMWK. Factorul XII şi prekalikreina pot activa direct plasminogenul, iar kininele rezultate sub acţiunea kalikreinei stimulează eliberarea de t-PA din endoteliile vasculare. Pe de altă parte, factorul XII se activează sub acţiunea plasminei. Interacţiunile complexe dintre factorii de activare prin contact şi sistemul fibrinolitic se reflectă şi pe plan clinic la pacienţii cu deficit de factor XII (boală Hageman) care nu dezvoltă manifestări hemoragice, fiind mai degrabă predispuşi la accidente trombotice.

13.7.2.4 Alţi activatori ai fibrinolizei

Streptokinaza este un activator al fibrinolizei obţinut din tulpini de streptococ hemolitic, fiind utilizată ca agent terapeutic în tromboliză. Acţiunea sa se exercită prin formarea unui complex cu plasminogenul căruia îi induce o modificare conformaţională, acest complex activând ulterior alte molecule de plasminogen.

13.7.3 Inhibitorii fibrinolizei

Controlul fibrinolizei se realizează la două nivele, de către două tipuri de inhibitori. Un prim nivel are loc chiar în etapa activării, unde intervin inhibitorii activatorului plasminogenului (PAI). Un alt nivel de control se realizează prin inhibarea plasminei în mod specific de către α2 antiplasmină, respectiv în mod nespecific de către alţi inhibitori de proteaze (α2 macroglobulină, α1 antitripsină).

13.7.3.1 Inhibitorii activatorului plasminogenului

PAI-1

Este o proteină din superfamilia serpine, produs în hepatocite şi celulele endoteliale, dar şi în plachetele sangvine, fibroblaşti şi celulele musculare netede. Insulina stimulează producţia de PAI hepatic, în timp ce PAI endotelial este sintetizat sub acţiunea citokinelor proinflamatorii şi a endotoxinelor, fiind deci un reactant de fază acută.Toate tipurile de PAI inhibă atât t-PA cât şi u-PA.

PAI-2

A fost extras din placentă, dar şi din monocite, granulocite şi celulele unor linii tumorale. Activitatea inhibitorie a PAI-2 este mai puternică împotriva u-PA, iar rolul său fiziologic ar consta în protejarea organismului matern de o activare masivă a fibrinolizei în perioada sarcinii şi în expulzie.

PAI-3

Este produs de hepatocite, fiind identic cu inhibitorul proteinei C (PCI), ponderea sa fiind redusă în economia generală a fibrinolizei.

13.7.3.2 α2 antiplasmina

Este principalul inhibitor al plasminei, fiind o proteină din superfamilia serpine, sintetizată de ficat. Molecula sa are un situs care inhibă centrul activ al plasminei, procesul fiind extrem de rapid. Un alt situs, conţinând lizină de pe molecula de α2 antiplasmină serveşte la legarea reversibilă a acesteia de plasminogen, la nivelul situsurilor LBS ale acestuia. α2 antiplasmina se leagă covalent în

reţeaua de fibrină sub acţiunea factorului XIII stabilizator al fibrinei, acest mecanism prevenind o degradare prematură a dopului hemostatic.

13.7.3.3 Inhibitorul fibrinolizei activat de trombină *(Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor - TAFI)* este un atenuator al fibrinolizei. El îşi exercită rolul prin acţiunea sa procarboxipeptidazică, îndepărtând resturi de Lys din reţeaua de fibrină, ceea ce determină o legare mai redusă a plasminogenului de aceasta, cu scăderea concentraţiei de plasminogen din reţeaua de fibrină, respectiv degradare diminuată a fibrinei de către plasmină.

TAFI este activat de plasmină şi de către complexul trombină – trombomodulină, fiind o verigă de legătură între coagulare şi fibrinoliză.

El este de asemenea implicat în repararea tisulară şi răspunsul inflamator. TAFI este implicat în numeroase stări patologice asociate cu tendinţă la tromboze, cum ar fi rezistenţa la proteina C activată, accidentele vasculare cerebrale, boala coronariană, preeclampsia şi sindromul metabolic.

Nivelele scăzute de TAFI, aşa cum apar la pacienţii cu ciroză, la hemofilici sau la cei cu leucemie acută promielocitară contribuie la potenţialul profibrinolitic crescut al acestor subiecţi.

13.7.3.4 Alţi inhibitori ai fibrinolizei

- α2 macroglobulina este un inhibitor general de proteaze, având rolul unei a doua linii de apărare, iar acţiunea sa asupra plasminei se exercită în mod lent, progresiv.
- α1 antitripsina intervine de asemenea în mod lent şi progresiv ca inhibitor al plasminei
- inhibitorul componentei C1 a complementului (C1-INH) intervine în inhibarea fibrinolizei pe calea intrinsecă, prin efectul pe care îl exercită asupra factorului XII, kalikreinei şi HMWK.
- inhibitorii sintetici au o structură similară lizinei, intrând în competiţie cu radicalii lizină din structura fibrinei şi limitând legarea plasminogenului în reţeaua de fibrină. Ei sunt utilizaţi în scop terapeutic, iar reprezentantul tipic al acestor inhibitori sintetici este acidul epsilon aminocaproic (EACA).

13.7.4 Explorarea fibrinolizei

13.7.4.1 Timpul de liză al cheagului de sânge diluat

Urmăreşte timpul în care se lizează cheagul obţinut prin coagularea cu trombină a sângelui diluat în tampon acetat. Valorile se situează între 150 şi 300 de minute.

13.7.4.2 Timpul de liză al euglobulinelor

Prin precipitarea euglobulinelor (plasminogen, fibrinogen, activatori ai fibrinolizei) se limitează efectul inhibitorilor fibrinolizei. Valoarea normală este de peste 3 ore.

13.7.4.3 Dozarea PDF şi D-D

În urma fibrinolizei rezultă produşi de degradare ai fibrinei şi fibrinogenului (PDF). D dimerii (D-D) fac parte din PDF, dar ei rezultă prin degradarea fibrinei stabilizate de factorul XIII, diferenţiind astfel fibrinoliza de fibrinogenoliză.

13.7.4.4 Alte teste

În laboratoare specializate se poate face dozarea plasminogenului, a t-PA, PAI.

Recent a fost pus la punct un test global de explorare a fibrinolizei (*Fibrinolysis Parameters Assay*, FIPA), în care plasma este incubată cu reactivul FIPA, conţinând urokinază şi acid tranexamic (un inhibitor al reacţiei plasmină - α2 antiplasmină). După o incubare de 10 min, activarea fibrinolizei este stopată cu arginină, iar activitatea plasminei generate este măsurată cu ajutorul unui substrat cromogenic, şi exprimată în raport cu cea a unei plasme normale, valoarea activităţii fiind de 100 ±15%.

13.7.5 Patologia fibrinolizei

13.7.5.1 Perturbări genetice ale fibrinolizei care evoluează cu tendinţă la hemoragie

- *Deficitul familial de α2 antiplasmină (boala Miyasato).* A fost descris la un număr mic de familii şi se manifestă prin epistaxis, hematurie, hemartroze, hematoame cerebrale şi intramusculare şi mai ales hemoragii după traumatisme, survenind la câteva ore de la incident (hemoragii în doi timpi). Deficitul de α2 antiplasmină poate fi cantitativ, cu scăderea atât a antigenului cât şi a funcţiei, sau funcţional, anomaliile putând interfera cu legarea α2 antiplasminei de reţeaua de fibrină, de plasminogen sau de centrul activ al plasminei. Deşi cheagul acestor pacienţi este neprotejat faţă de fibrinoliză, fenomenul nu se însoţeşte de o activare a fibrinolizei sistemice, datorită intervenţiei inhibitorilor generali de proteaze (α2 macroglobulina, α1 antitripsina)
- *Sinteză/ eliberare crescută de t-PA din endotelii.* Nivele crescute de t-PA au fost asociate cu infertilitatea masculină şi feminină.
- *Deficit de PAI.*

13.7.5.2 Perturbări genetice ale fibrinolizei care evoluează cu tendinţă la tromboze

• *Anomalii familiale ale plasminogenului.* Aceste defecte pot evolua cu o sinteză redusă a plasminogenului (hipoplasminogenemii familiale) sau ca deficite funcţionale (displasminogenemii), în care plasminogenul nu se leagă de t-PA sau generează o plasmină inactivă. Deficitul homozigot tip I de plasminogen se soldează cu depuneri masive de fibrină în spaţiile extravasculare ale mucoaselor şi cu apariţia conjunctivitei lemnoase.

• *Reducerea activităţii t-PA* se datorează sintezei sau eliberării sale deficitare din endotelii.

• *Disfibrinogenemii asociate cu o fibrinoliză deficitară.* Prin coagulare fibrinogenul poate forma o reţea de fibrină cu afinitate scăzută faţă de plasminogen, având drept consecinţă încetinirea fibrinolizei.

13.7.5.3 Perturbări dobândite ale fibrinolizei asociate cu o fibrinoliză accelerată

• *Ciroza hepatică.* La cirotici apare o creştere a nivelului circulant de t-PA (a cărui inactivare în ficat este redusă în acest caz) şi o diminuare a potenţialului antifibrinolitic (prin scăderea α2 antiplasminei). Reţeaua de fibrină este mai puţin consolidată prin scăderea factorului XIII. Valorile PAI pot avea o mare dispersie individuală, ţinând cont că PAI-1 se eliberează şi din endotelii în contextul existenţei unei reacţii inflamatorii.

• *Leucemia acută promielocitară.* La aceşti pacienţi fibrinoliza este accelerată datorită acţiunii proteazelor leucocitare asupra α2 antiplasminei, factorului XIII şi fibrinogenului, dopul hemostatic fiind deosebit de susceptibil la fibrinoliză.

13.7.5.4 Perturbări dobândite ale fibrinolizei asociate cu o fibrinoliză încetinită

Starea postoperatorie, în special după intervenţii pe abdomen, evoluează cu creşteri ale potenţialului antifibrinolitic, prin creşterea secreţiei de PAI mediată de citokinele de fază acută care determină şi creşterea fibrinogenului, factorului VIII şi vWF, creându-se astfel condiţii propice apariţiei de tromboze.

Vasculitele se caracterizează prin procese inflamatorii ale endoteliilor, însoţite de eliberarea de citokine proinflamatorii, care determină o eliberare crescută de PAI din endotelii, scăderea eliberării de t-PA, concomitent cu o expunere crescută a factorului tisular şi eliberarea de factor vWF care transportă factorul VIII.

Sindromul metabolic este o entitate în care se asociază anomalii ale lipidelor serice (hipertrigliceridemie, HDL scăzut şi prezenţa LDL dense), rezistenţa la insulină, hipertensiune şi un status protrombotic. Acesta evoluează cu creşteri ale factorului XIII şi fibronectinei, precum şi cu nivele crescute de PAI-1 şi α_2 antiplasmină, fibrinoliza fiind încetinită la aceşti subiecţi.

13.8 Particularităţi ale hemostazei în diferite stări fiziologice şi patologice

13.8.1 Sindroame hemoragice ale nounăscutului

La nou născut mecanismele hepatice de sinteză a factorilor coagulării sunt incomplet dezvoltate (fenomen şi mai evident la cei născuţi prematur), astfel încât aceştia au nivele mai reduse ale factorilor dependenţi de vitamina K, precum şi a factorilor XI şi XII. Nivelele plasmatice de antitrombină, PC şi PS sunt de asemenea mai scăzute. Factorii V şi VIII au nivele comparabile cu cele de la adult. În decurs de câteva săptămâni nivelele factorilor coagulării ating valorile normale ale adultului; în schimb, concentraţiile de proteină C şi S se normalizează abia în jurul vârstei de 3-6 luni. Acest decalaj între potenţialul procoagulant şi deficitul relativ al unor mecanisme anticoagulante generează o mai mare susceptibilitate la apariţia CID în caz de infecţii cu unii agenţi patogeni.

Aportul alimentar redus de vitamină K, absenţa florei microbiene intestinale saprofite, eventualele administrări de antibiotice creează la nou născut premisele instalării unei carenţe de vitamină K. Deficitul tranzitor de vitamină K poate genera o serie de manifestări hemoragice denumite boala hemoragică a nou născutului, manifestată de obicei prin hemoragii digestive sub formă de melenă, sau chiar prin hemoragii din bontul ombilical, hematoame cefalice, echimoze extinse. Manifestările cedează la administrarea de vitamină K.

13.8.2 Particularităţi ale hemostazei în sarcină

În sarcină echilibrul hemostatic este mai precar, ceea ce are drept consecinţe clinice variate ca severitate şi ca manifestare (atât hemoragice cât şi trombotice). Modificările hemostazei se instalează începând cu sfârştul primului trimestru şi constau în creşteri ale fibrinogenului plasmatic, ale factorilor II, IX şi X, precum şi a factorului VIII

şi a vWF (în special a unor forme cu un grad mai redus de polimerizare) - aceştia fiind eliberaţi datorită stimulării de durată a celulelor endoteliale. Factorul XIII şi AT III au nivele scăzute. La nivelul circulaţiei uteroplacentare are loc un proces localizat şi de mică intensitate de generare de trombină şi degradare a depozitelor trombotice, ceea ce se reflectă în creşterea moderată a nivelului de produşi de degradare ai fibrinei şi fibrinogenului (fibrinopeptid A) şi prezenţa monomerilor de fibrină solubilă, precum şi a complexelor AT-factori activaţi ai coagulării. Activitatea fibrinolitică sistemică este însă încetinită datorită producţiei crescute de PAI-2 la nivelul placentei.

În condiţiile exacerbării patologice a acestor aspecte fiziologice apare disgravidia tardivă, respectiv preeclampsia şi eclampsia. În acest context apare o scădere a numărului de plachete prin consum, creşterea monomerilor solubili de fibrină şi a PDF. În formele mai severe aceste aspecte se extind şi la circulaţia terminală de la nivel renal.

Unele complicaţii ale sarcinii (embolia cu lichid amniotic, sarcina oprită în evoluţie, ruptura uterină sau de placentă, mola hidatiformă) pot declanşa fenomenul de coagulare intravasculară diseminată.

La gravide este contraindicată administrarea anticoagulantelor orale (alternativa terapeutică fiind heparinele), deoarece antagoniştii vitaminei K perturbă sinteza osteocalcinei, o proteină din ţesutul osos dependentă de vitamina K, existând prin urmare riscul de apariţie a malformaţiilor scheletului la nou născut.

13.8.3 Particularităţi ale hemostazei în neoplazii

Neoplaziile sunt grevate de modificări complexe ale hemostazei, care interesează toate componentele acesteia (perete vascular, plachete, coagulare şi fibrinoliză) şi care se traduc prin tromboze (preponderent în cazul tumorilor solide) sau prin hemoragii (mai frecvente în cazul hemopatiilor maligne). Mecanismele care duc la perturbările hemostazei ţin fie de particularităţile celulelor maligne, fie de impactul general pe care îl au neoplazia şi complicaţiile acesteia asupra organismului.

Afectarea peretelui vascular în cancere se datorează fie invaziei directe a celulelor neoplazice, fie unor mecanisme imune. Pe de altă parte, creşterea masei tumorale este în mare măsură condiţionată de angiogeneză. Celulele tumorale cât şi unele celule ale sistemului imun (monocite, limfocite T) exprimă şi secretă factori care determină atragerea şi proliferarea celulelor endoteliale. Aceşti factori proangiogenici sunt: factorul de creştere al endoteliilor vasculare (VEGF), factorul permeabilizator vascular (VPF), factorul de creştere transformant α şi β (TGF α, β), factorii de creştere a fibroblaştilor (FGF 1-7), factorul de creştere derivat din plachete (PDGF), factorul tisular (TF), activatorul de tip urokinază al plasminogenului (uPA). O enzimă secretată de endotelii, heparanaza, care clivează heparan sulfatul pare a fi implicată în potenţialul proangiogenic şi metastatic al tumorilor. Celulele neoplazice dar şi efectorii imuni secretă şi factori anti angiogenici, cum ar fi inhibitorul tisular al metaloproteinazelor (TIMP), angiostatina, inhibitorul activatorului plasminogenului (PAI). Procesul de creştere şi diseminare a tumorii poate fi influenţat de dezechilibrul între mecanismele pro şi anti angiogenice.

Anomaliile plachetelor sangvine

În cancere se înregistrează anomalii cantitative (scăderi sau creşteri ale numărului de plachete) şi calitative ale trombocitelor.

Trombocitopeniile se produc cel mai adesea prin scăderea producţiei consecutivă invadării medulare, sau prin distrucţie accelerată periferică. Aceasta se poate produce prin mecanism imun, prin consum în cadrul unor procese de CID sau mai rar prin sechestrare splenică sau în hemangioame.

Trombocitemiile apar îndeosebi în cadrul sindromului mieloproliferativ cronic (trombocitemie esenţială, leucemie granulocitară cronică, policitema vera).

Adezivitatea şi agregabilitatea plachetară sunt în general accentuate în tumorile solide, în timp ce în sindroamele mieloproliferative apare o diminuare a funcţiei plachetare.

Perturbări ale coagulării

Chiar în absenţa trombozelor manifeste clinic, la pacienţii cu neoplazii se constată o activare sistemică a coagulării, corespunzătoare cu un sindrom cronic de CID şi care se traduce prin creşterea nivelelor plasmatice de fibrinopeptid A, complexe AT - factori activaţi ai coagulării, şi a produşilor rezultaţi din activarea plachetelor sangvine (beta tromboglobulina, PF4). În activarea sistemică a coagulării intervin mai multe mecanisme, printre care:

- hiperexpresia factorului tisular pe celulele neoplazice, dar şi pe cele endoteliale, monocite/ macrofage şi limfocite, acest mecanism părând să influenţeze capacitatea de metastazare;
- hiperexpresia pe unele celule neoplazice a receptorilor pentru factorul V (celule leucemice)

sau pentru trombină (cancer mamar), care se corelează cu potenţialul invaziv al tumorii;

- procoagulantul legat de celulele canceroase (cancer procoagulant), care activează direct factorul X.

Perturbări ale fibrinolizei

Fibrinoliza joacă un rol important în diseminarea tumorală, facilitând mobilizarea celulelor canceroase. Unele celule tumorale exprimă pe suprafaţa lor activator tisular al plasminogenului (t-PA), activator de tip urokinază (u-PA) şi receptorul pentru u-PA (u-PAR). La unii pacienţi cu tumori solide se înregistrează nivele plasmatice crescute ale PAI-1, care contribuie la tendinţa spre tromboze. În leucemia acută promielocitară LAM3, degradarea α2 antiplasminei de către elastaza leucocitară determină o accelerare a fibrinolizei.

13.8.4 Particularităţi ale hemostazei în boli renale

În bolile renale pot apare atât manifestări hemoragice cât şi fenomene trombotice, în funcţie de mecanismele patogenetice ale afecţiunii renale respective.

Sindromul nefrotic

Pierderea urinară de proteine interesează şi antitrombina III, cu masă moleculară joasă, în timp ce alţi factori ai coagulării cu mase moleculare mari vor fi crescuţi (fibrinogen, factor V, factor VIII, factor XIII, fibronectină). Factorii coagulării dependenţi de vitamina K (II, VII, IX, XI) deşi au o masă moleculară similară cu AT III nu se pierd la nivel renal, datorită încărcării lor electronegative şi respingerii lor electrostatice la nivelul capsulei Bowman. La creşterea nivelului lor plasmatic contribuie şi sinteza accelerată de proteine şi lipoproteine în ficat cauzată de scăderea presiunii coloidosmotice. Prin aceleaşi mecanisme se explică creşterea nivelelor de proteină C şi S. În sindromul nefrotic proteina S se găseşte în mare proporţie legată de C4bBP (un reactant de fază acută), iar fracţiunea liberă, care este cofactor al proteinei C este în cantitate redusă, funcţionalitatea acestui sistem anticoagulant fiind astfel limitată. Factorul von Willebrand are valori crescute ca urmare a stimulării eliberării sale din celulele endoteliale. Dezechilibrele menţionate au ca efect o creştere a riscului pentru evenimente trombotice.

Pacienţii cu sindrom nefrotic au în principiu un potenţial antifibrinolitic ridicat (prin sinteza crescută de PAI-1, α2 antiplasmină, α2 macroglobulină). Totuşi, fibrinoliza este moderat accelerată. Explicaţia acestui fenomen ar putea fi faptul că în sindromul nefrotic, albumina, care în mod normal limitează activarea fibrinolizei prin limitarea formării complexelor între t-PA, plasminogen şi fibrină, are nivele foarte scăzute. Astfel, este favorizată acţiunea t-PA al cărui nivel este doar moderat crescut în plasma bolnavilor cu sindrom nefrotic.

Glomerulonefritele

În patogeneza şi evoluţia glomerulonefritelor o verigă importantă o constituie depunerea de fibrină la nivelul glomerulilor. Acest proces este cauzat de expunerea factorului tisular de către celulele endoteliale lezate şi de către monocitele infiltrate în glomeruli. Deşi acumularea de material trombotic este localizată, în glomerulonefrite există şi modificări sistemice ale hemostazei, traduse prin creşterea nivelelor de fibrinogen, vWF şi PAI-1.

Insuficienţa renală cronică

Insuficienţa renală cronică este asociată cu o tendinţă la hemoragii, cauzate în principal de alterări ale hemostazei primare, respectiv de scăderea adezivităţii şi agregării plachetare. Reactivitatea redusă a plachetelor sangvine s-ar datora unui complex de perturbări în care sunt incluse acumularea de AMPc în plachete ca urmare a hiperparatiroidismului secundar, efectului combinat al ureei, creatininei, compuşilor fenolici şi acidului guanidinosuccidinic, precum şi prezenţei formelor multimerice cu greutate mică a vWF, care au o funcţionalitate diminuată ca mediatori ai interacţiunii dintre plachtete şi peretele vascular.

13.8.5 Particularităţi ale hemostazei în boli hepatice

Ficatul are un rol important în sinteza unor factori ai coagulării (factorii II, V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, fibrinogenul), fibrinolizei (plasminogen, α2 antiplasmină, PAI-1), mecanismelor anticoagulante (AT III, PC, PS) intervenind pe de altă parte şi în degradarea vWF, a factorului VIII şi a factorilor activaţi ai coagulării. Pacienţii cu afecţiuni hepatice severe prezintă perturbări complexe ale hemostazei, soldate cu tendinţă la sângerare. Mecanismele care concură la această predispoziţie sunt complexe şi includ deficitul de vitamină K, reducerea sintezei unor factori ai coagulării, consumul factorilor coagulării într-un sindrom de CID, fibrinoliza accelerată, trombocitopenia şi fragilitatea capilară.

Deficitul de vitamină K apărut în contextul icterului mecanic sau al unui sindrom de malab-

sorbţie lipidică are drept consecinţă apariţia formelor nefuncţionale ale factorilor coagulării dependenţi de vitamina K, denumite PIVKA, ceea ce se reflectă în prelungirea timpului de protrombină şi normalizarea lui după administrarea parenterală a vitaminei K.

Alterarea funcţiei proteosintetice a ficatului se traduce prin scăderea factorilor II, V, VII, X, a factorului XIII, în timp ce fibrinogenul este în limite normale, iar factorul VIII şi vWF sunt crescuţi (prin scăderea inactivării lor). Scăderea factorului V este un indicator fidel al funcţiei proteosintetice hepatice, deoarece sinteza sa nu depinde de vitamina K. În insuficienţa hepatică supraacută scăderile cel mai rapide le înregistrează factorul VII care are un T/2 scurt (6-8 ore).

Accelerarea fibrinolizei apare în cazul cirozelor hepatice decompensate şi se datorează reducerii sintezei de PAI-1, α2 antiplasmină, factor XIII stabilizator al fibrinei şi nivelului crescut de t-PA care este slab inactivat în ficat. De menţionat că în tumorile hepatice şi în hepatopatiile colestatice activitatea fibrinolitică este însă încetinită.

Trombocitopenia întâlnită la bolnavii cu ciroză hepatică se explică prin sechestrarea în splină a plachetelor precum şi printr-un mecanism imunologic, constând în depunerea de complexe imune nespecifice pe suprafaţa plachetelor, care astfel vor fi mai rapid înlăturate din circulaţie. Adezivitatea şi agregabilitatea plachetară sunt de asemenea diminuate, probabil prin alterări ale structurii lipidice membranare şi/sau astenizarea plachetelor în urma sechestrării splenice sau a contactului cu complexele imune.

13.8.6 Anomaliile hemostazei şi sindromul metabolic

Factorii de risc metabolici şi un grad redus de inflamaţie asociată acestui sindrom determină un echilibru precar al balanţei hemostatice.

La aceşti indivizi se descrie o hiperreactivitate plachetară, asociată cu un grad de hipercoagulabilitate (nivele crescute de factori VII, X şi XIII şi fibrinogen), precum şi o fibrinoliză mai încetinită, prin creşterea potenţialului antifibrinolitic (creşterea nivelului de PAI-1 şi α2 antiplasmină). Cu toate că şi factorii anticoagulanţi sunt crescuţi, înregistrându-se nivele ridicate de PC, PS şi într-o mai mică măsură de AT III, modificările globale ale hemostazei predispun aceşti pacienţi la evenimente trombotice. De fapt, acest echilibru hemostatic precar poate fi perturbat prin dezvoltarea unei disfuncţii endoteliale care duce la scăderea mecanismelor antitrombotice şi la accentuarea celor protrombotice în peretele arterial. Un exces de acizi graşi eliberaţi de către ţesutul adipos şi ajunşi la ficat pe cale portală va determina nu doar o steatoză ci şi o stimulare a sintezei hepatice de factori procoagulanţi şi de inhibitori ai fibrinolizei.

13.8.7 Coagularea intravasculară diseminată (CID)

CID este o perturbare complexă a hemostazei în care apar atât fenomene trombotice (prin activarea intravasculară a coagulării şi depunerea de fibrină şi plachete în capilare) cât şi hemoragii (datorate consumului plachetelor şi factorilor coagulării), fiind considerată o verigă patogenetică implicată în numeroase stări patologice.

Activarea coagulării se produce prin expunerea factorului tisular pe celulele endoteliale şi pe monocite, urmată de activarea factorului VII şi declanşarea reacţiilor de pe calea extrinsecă. Trombina formată amplifică şi calea intrinsecă, prin activarea factorului VIII, rezultând depozite de fibrină.

Mecanismele antitrombotice ale endoteliilor sunt deprimate (deficit de heparan şi dermatansulfat, scăderea trombomodulinei, a TFPI) sub acţiunea agenţilor declanşatori (endotoxine, radicali superoxid), consecinţa fiind reducerea eficienţei funcţionale a antitrombinei III, cofactorului II al heparinei şi sistemului proteinei C.

Fibrinoliza are un comportament bifazic, fiind iniţial activată compensator prin eliberarea de t-PA din endotelii, ceea ce se reflectă prin creşterea PDF şi a complexelor plasmină/ α2 antiplasmină. În faza următoare activitatea fibrinolitică scade prin epuizarea eliberării de t-PA endotelial şi prin inactivarea t-PA circulant de către PAI.

Manifestările clinice ale CID sunt consecinţa formării de microtrombi care obstruează microcirculaţia şi determină apariţia insuficienţei pluriorganice. Prin consumul factorilor coagulării şi al plachetelor, la care se sumează leziunile pereţilor vasculari se produc fenomene hemoragice.

Conduita terapeutică vizează în principal tratamentul etiologic şi menţinerea perfuziei organelor afectate. Factorii consumaţi trebuie înlocuiţi prin tratatment substitutiv (sânge proaspăt sau derivate). Pentru a împiedica extinderea trombozelor se administrează heparină ca tratament anticoagulant. Tratamentul cu inhibitori ai fibrinolizei este contraindicat, fibrinoliza fiind în CID un mecanism compensator.

Tabelul 13.VIII. Stări patologice asociate cu CID

- Septicemii (în special cu microorganisme Gram negative)
- Complicaţii obstetricale (eclampsie, embolie cu lichid amniotic, ruptură de placentă, molă hidatiformă)
- Hemoliză intravasculară
- Reacţii imune intravasculare
- Veninuri şi toxine animale
- Proteze valvulare şi vasculare, circulaţie extracorporeală
- Traumatisme severe, arsuri
- Neoplazii
- Boli hepatice severe

Tabelul 13.IX. Diagnosticul de laborator în CID

- Evidenţierea coagulopatiei de consum (↓ plachetelor, prelungirea PT, APTT, ± ↓ fibrinogenului)
- Evidenţierea produşilor rezultaţi prin activarea coagulării *in vivo* (monomeri solubili de fibrină, fibrinopeptid A, F1+2, βTG, PF4)
- Evidenţierea răspunsului fibrinolitic compensator (PDF, DD)
- Evidenţierea complexelor între factorii activaţi ai coagulării şi antitrombină, a complexelor plasmină/ α2 antiplasmină)

13.8.8 Anomalii ale coagulării legate de prezenţa unor anticoagulanţi circulanţi

Aceşti inhibitori pot fi dirijaţi specific împotriva factorilor coagulării, fie sunt anticorpi antifosfolipide (aşa zisul anticoagulant lupic).

Anticorpi dirijaţi specific împotriva unor factori ai coagulării aparţin de obicei clasei Ig G şi apar de cele mai multe ori la pacienţi politransfuzaţi, în contextul unei alloimunizări. Cel mai frecvent aceşti anticorpi sunt întâlniţi în cazul hemofiliei A (Ac antifactor VIII) sau al hemofiliei B (Ac antifactor IX), precum şi la pacienţi cu boală von Willebrand (Ac anti vWF). Anticorpii dirijaţi contra celorlaţi factori ai coagulării sunt faorte rar întâlniţi. Se mai descriu cazuri de anticorpi antifactor XIII, majoritatea apărând în contextul tratamentului cu izoniazidă. Uneori anticorpii apar la lăuze sau la pacienţi cu diverse anomalii ale răspunsului imun. Prezenţa acestor anticorpi predispune la hemoragii.

Anticorpii antifosfolipide apar în contextul unor boli autoimune, hemopatii maligne, neoplazii, tratamente medicamentoase sau în lipsa unei cauze evidente. Aceşti anticorpi sunt reprezentaţi de molecule de IgG şi/sau IgM, mai rar IgA. Anticorpii sunt dirijaţi în realitate împotriva unor complexe formate din fosfolipide (cardiolipina şi fosfatidilserina) şi proteine (β2 glicoproteina I şi protrombina). Deşi prezenţa anticorpilor antifosfolipide determină *in vitro* prelungirea timpilor de coagulare în care sunt implicate fosfolipidele, totuşi manifestările clinice ale sindromului antifosfolipide constau în tromboze arteriale sau venoase. S-a sugerat că mecanismul prin care anticorpii antifosfolipide determină tromboze ar fi o competiţie în legarea de celule între aceştia şi anexina A5, ceea ce ar duce la reducerea proprietăţilor anticoagulante ale anexinei. Alte manifestări clinice sunt pierderile recurente de sarcină şi trombocitopenia. Evidenţierea în laborator a anticorpilor antifosfolipide se face prin prelungirea timpilor de coagulare dependenţi de fosfolipide (APTT, APTT diluat, testul cu venin de Vipera Russelli diluat) şi prin lipsa de corectare a coagulabilităţii într-un amestec format dintr-o plasmă normală şi plasma de pacient.

13.9 Trombozele

Tromboza reprezintă consecinţa activării patologice a fenomenelor fiziologice ale hemostazei. În producerea trombozelor intervin factorii triadei lui Virchow: leziunea endotelială, staza şi perturbarea echilibrului hemostazei.

13.9.1 Etiologia trombozelor

Cauzele producerii de tromboze pot fi genetice sau dobândite, sau asocieri ale acestora.

Anomaliile familiale ale hemostazei cu potenţial protrombotic sunt prezentate în *Tabelul 13.X.*

De menţionat că diversele mutaţii se pot asocia la acelaşi individ, crescând riscul pentru evenimente trombotice, iar la evaluarea potenţialului trombogen al diferitelor mutaţii trebuie

Tabelul 13.X. Anomalii familale ale hemostazei cu potenţial protrombotic

1. *Deficite cantitative sau calitative ale mecanismelor anticoagulante*
   - AT III
   - PC
   - PS
   - HC II
2. *Deficite de inactivare a unor factori ai hemostazei*
   - Factor V Leiden – rezistenţa la proteina C activată
   - Factor VIII336 Arg→Ile – activitate specifică crescută
   - Defect de proteoliză a multimerilor vWF – purpură trombotică trombocitopenică
3. *Creşterea sintezei unor factori procoagulanţi*
   - Factor VII (353Arg/Gln)
   - Protrombină (20210 G→A)
   - Deleţia unor peptide din factorul VIII
4. *Anomalii ale fibrinolizei*
   - Disfibrinogenemii
   - Anomalii ale t-PA
   - Displasminogenemii
   - ↑ PAI-1

avută în vedere şi eventuala asociere a altor condiţii patologice favorizante aşa cum sunt:

- Vârsta înaintată
- Antecedente personale şi familiale de tromboză
- Imobilizare prelungită
- Insuficienţă cardiacă congestivă
- Varice
- Obezitate
- Sarcină
- Contraceptive orale, tratament estrogenic
- Intervenţii chirurgicale (micul bazin, chirurgie oncologică, ortopedică –şold, genunchi)
- Cancere, leucemii
- Poliglobulie
- Hemoglobinuria paroxistică nocturnă
- Colagenoze
- Sindrom nefrotic
- Hiperlipoproteinemii aterogene*
- Diabet zaharat *
- Fumat*
- Hiperuricemie*

**Mai ales tromboze arteriale*

Obezitatea şi hiperlipoproteinemiile (IIb, IV, V) sunt caracterizate prin creşterea potenţialului antifibrinolitic (creşterea PAI-1 şi a factorului XIII stabilizator al fibrinei), precum şi a celui procoagulant (nivele crescute de factor VII şi X). Cu toate că la aceşti subiecţi se înregistrează şi nivele crescute de PC şi PS, echilibrul hemostatic este precar, putând fi deplasat în sensul trombozei dacă se adaugă procese inflamatorii, diabet zaharat sau hiperuricemie, care afectează tromborezistenţa endotelială, după cum s-a arătat anterior.

Intervenţiile chirurgicale, procesele inflamatorii, neoplaziile şi colagenozele declanşează sinteza de citokine proinflamatorii, care amorsează reacţia de fază acută, caracterizată prin creşterea fibrinogenului şi eliberarea din endotelii a vWF, a factorului VIII şi a PAI-1.

Predispoziţia la tromboze din sindromul nefrotic se explică prin pierderile de AT III şi creşterea nivelelor de fibrinogen, factor V, factor VIII, factor XIII, vWF şi fibronectină. Cu toate că proteina C înregistrează nivele crescute, funcţionalitatea sa este limitată de nivelul scăzut al cofactorului ei, forma liberă a proteinei S.

13.9.2 Explorarea de laborator a trombozelor

Aceasta ar trebui să cuprindă:

- Hemoleucogramă (număr de plachete, hematii)
- Depistarea rezistenţei la proteina C activată (+ evidenţierea factorului V Leiden)
- Detectarea mutaţiei G20210A a protrombinei
- Determinarea AT III, PC, PS (activitate ± antigen)
- Depistarea hiperhomocisteinemiei.

În cazul suspiciunii de sindrom antifosfolipidic se impune determinarea anticorpilor anticardiolipină, antifosfatidilserină, anti β2GP1, antiprotrombină.

La pacienţii cu tromboze se pot evidenţia în circulaţie produşi rezultaţi din activarea plachetelor (PF4, β tromboglobulină), sau a clivării fibrinogenului (FpA, FpB), precum şi din degradarea fibrinei (D dimeri). De menţionat că determinarea D-dimerilor este utilă mai ales pentru excluderea trombozei venoase profunde, principala limită fiind însă rezultatele fals pozitive, mai ales la pacienţii care au procese inflamatorii coexistente sau neoplazii.

13.9.3 Supravegherea tratamentului anticoagulant

13.9.3.1 Tratamentul cu heparine

Heparinele sunt mucopolizaharide sulfatate naturale, care acţionează prin potenţarea acţiunii antitrombinei. Complexul heparină- AT are o acţiune inhibitorie asupra factorului IIa şi a factorului Xa.

Heparinele standard (nefracţionate) au o acţiune egală anti IIa şi anti Xa. Monitorizarea tratamentului se face prin testul APTT. Recoltarea trebuie făcută din braţul contralateral perfuziei, la 6 ore de la debutul tratamentului sau de la modificarea dozei (în caz de administrare continuă), sau la jumătatea intervalului dintre administrări (în caz de administrare intermitentă). Valoarea APTT trebuie să fie 2-3 ori mai prelungită decât cea a martorului, testul fiind efectuat zilnic. Având în vedere că PF4 eliberat de plachete poate modifica heparinemia, plasma trebuie separată în decurs de o oră de la recoltare.

La pacienţii trataţi cu doze mari de heparină (angioplastie, by pass cardiopulmonar, hemodializă) la care APTT-ul este nemăsurabil sau în cazul în care se impune un rezultat rapid în vederea monitorizării tratamentului cu heparină se recurge la un test denumit Activated Clotting Time (ACT). Acest test se face din sânge integral, recoltat într-un tub sau cartuş ce conţine activatori ai căii intrinseci. Prin introducerea tubului într-un aparat special, se măsoară timpul de coagulare al sângelui. Valorile normale sunt între 70-180 secunde. Limitele acestui test sunt precizia mai mică decât cea a APTT, relativa lipsă de standardizare a diferitelor metode, precum şi faptul că rezultatele sunt influenţate de numărul şi funcţia plachetelor, temperatura ambiantă, hipotermie, hemodiluţie.

Heparinele fracţionate (cu greutate moleculară joasă) au o activitate puternică anti Xa şi mai slabă anti IIa. Administrarea lor nu modifică testul APTT. În caz de administrare profilactică nu este necesară supravegherea de laborator. În caz de tratament al TVP constituite, supravegherea se face prin determinarea heparinemiei ca activitate anti-Xa, în cazuri particulare cum ar fi insuficienţa renală, caşexia sau obezitatea, apariţia hemoragiilor.

Având în vedere riscul apariţiei trombocitopeniei induse de heparină, în cazul administrării ambelor tipuri de heparine este necesară numărătoarea periodică a plachetelor.

13.9.3.2 Tratamentul cu anticoagulante orale (antivitamine K, AVK)

Vitamina K intervine în coagulare prin favorizarea acţiunii unei carboxilaze care duce la sinteza unor forme activabile, funcţionale ale factorilor II, VII, IX şi X. Procesul de carboxilare a acidului glutamic decurge în paralel cu o epoxidare a vitaminei K. Deoarece procesul de carboxilare al vitaminei K necesită prezenţa vitaminei K în formă redusă, este esenţială transformarea epoxidului vitaminei K sub acţiunea unei reductaze. Mecanismul de acţiune al anticoagulantelor orale (antagoniştilor vitaminei K) constă în inhibiţia competitivă a reductazei epoxidului vitaminei K; astfel, absenţa formei reduse a acesteia nu va permite carboxilarea acidului glutamic iar factorii rezultaţi (PIVKA) nu vor fi funcţionali. Cinetica descreşterii activităţii factorilor depinde de T/2 al acestora (F VII 6 ore, F IX 12 ore, F X 36 ore, F II 60 ore); din acest motiv instalarea efectului terapeutic durează câteva zile.

Tratamentul cu AVK se supraveghează prin efectuarea timpului de protrombină (PT, timp Quick), care din motive de standardizare se exprimă sub formă de INR. Primul control se face la 48 de ore de la iniţierea administrării, iar apoi tot la 48 de ore până la atingerea INR considerat optim pentru pacientul respectiv, în funcţie de patologia căreia i se adresează terapia anticoagulantă. Următoarele controale se fac bisăptămânal, apoi săptămânal, bilunar, până se ajunge la efectuarea lunară a PT.

Este important de ştiut că posologia variază în funcţie de regimul alimentar, de funcţia renală şi hepatică şi de numeroase medicamente care interferă prin potenţarea (antiinflamatoare nonsteroidiene, tetraciclină, neomicină, D tiroxină) sau diminuarea (barbiturice, colestiramină, etinilestradiol, rifampicină) efectului AVK. Răspunsul uneori capricios al pacienţilor la tratamentul cu AVK se poate datora şi unei reactivităţi individuale determinate genetic la acţiunea anticoagulantelor orale. Genele responsabile sunt gena pentru citocromul P450 (denumită CYP2C9) şi gena pentru complexul 1 al epoxid reductazei vitaminei K (VKORC1). A fost pus la punct şi un sistem care detectează variantele acestor gene, denumit Nanosphere Verigene Warfarin Metabolism Nucleic Acid Test.

Bibliografie selectivă

1. Ariens RAS, de Lange M, Snieder H, et al. *Activation markers of coagulation and fibrinolysis in twins: heritability of the prethrombotic state.* Lancet, 2002, 359: 667-71.
2. Brudaşcă I. *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): Physiology and clinical implications*.Fiziologia-Physiology, 2006, 16: 4-7.
3. Brudaşcă I., Cucuianu M. *Pathogenic role of abnormal fatty acids and adipokines in the portal flow.* Rom J. Intern. Med., 2007, 45,2, 131-218.
4. Brudaşcă I., Cucuianu M., Stancu A., Colhon D. M. *Plasma protein S antigen (PS:Ag) in selected disease states.* Rev Roum Med Int, 1994, 32(1):29-35.
5. Brudaşcă I., Goina A. *Sistemul proteinei Z-fiziologie şi implicaţii clinice.* Clujul Medical, 2006, 2, 321-326.
6. Cheong P. L., Lee w. T., Lin H. M., Lin K. H. *Moyamoya syndrome with inherited proteins C and S deficiency: report of one case.* Acta Pediatr Taiwan, 2005,46(1): 31-34.
7. Cucuianu M., Brudaşcă I., Trif I., Stancu A. *Clinical studies on plasma protein C. Correlation with serum cholinesterase.* Nouv Rev Fr Hematol, 1993, 35: 481- 486.
8. Cucuianu M., Cucuianu A. *Von Willebrand factor and cardiovascular disease. Restricted relevance.* Rom J Intern Med., 2006, 44: 3-17.
9. Cucuianu M. Crîsnic I. *Actualităţi în patologia hemostazei şi trombozei.* Ed. Vasile Goldiş University Press, Arad, 1999.
10. Cucuianu M., Knauer O., Roman S. *α2 antiplamin, Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) and dilute blood clot lysis time in selected disease states.* Thromb Haemost,1991, 66(5): 586-591.
11. Cucuianu M., Trif I., Cucuianu A. *Hemostaza: biochimie, fiziopatologie clinică.* Ed Dacia, Cluj Napoca 1994.
12. Cucuianu M., Vasile A., Popescu T.A., Crîsnic I., Tapalagă D. *Clinical studies concerning factor XIII; with special reference to hyperlipemia.* Thromb Diathes Haemorh (Stuttgart),1973, 30: 480-493.
13. Dahlbäck B *Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders.* Blood, 2008, Vol. 112, No. 1: 19-27.
14. Dahlbäck B., Villoutreix B. O. *Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway. Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition* . Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2005, 25:1311.
15. Giannakopoulos B et al. *Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome.* Blood, 2007, 109: 422-430.
16. Gierer P., Hoffmann J. N., Mahr F., Menger M.D., Mittlmeier, Gradl G. Vollmar B.*T Activated protein C reduces tissue hypoxia, inflammation, and apoptosis in traumatized skeletal muscle during endotoxemia.* Critical Care Medicine. 2007, 35(8):1966-1971.
17. Ida M., Satoh A., Matsumoto I., Kojima-Aikawa K. *Human Annexin V Binds to Sulfatide: Contribution to Regulation of Blood Coagulation.* J. Biochem, 2004, Vol. 135, No. 5: 583-588.
18. Kannemeier C., Shibamiya A., Nakazawa F., Trusheim H., Ruppert C., Markart P.,Song Y. et al. *Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation* . Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104(15): 6388–6393.
19. Maiello M., Torella M., Caserta L., Caserta R., Sessa M. et al *Hypercoagulability during pregnancy: evidences for a thrombophilic state* . Minerva Ginecol. 2006 , 58 (5): 417-422.
20. Mandal S. K., Pendurthi U. R., MohanRao V. *Cellular localization and trafficking of tissue factor* Blood, 2006, Vol. 107, No. 12: 4746-4753.
21. Minger A.M., Heimburger N., Zeitler P., Kreth W., Schuster V. *Homozigous type I plasminogen deficiency.* Semin Thromb Haemost, 1997, 23 (3):259-269.
22. Ratnoff. O. D., Forbes C.D. *Disorders of hemostasis.* Second Edition, W. B. Saunders Company, 1991.
23. Rizza C., Lowe G. *Haemophilia and other inherited bleeding disorders.* W.B. Saunders Company, 1997.
24. Stief, T. W. *Innovative Tests of Plasmatic Hemostasis* . Lab Med. 2008, 39(4): 225-230.
25. Tuddenham E. G. D., Cooper D. N. *The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders*, Oxford University Press, 1994.
26. Wadelius M, Pirmohamed M. *Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges.* Pharmacogenomics J, 2007, 7: 99–111.

Capitolul 14. Receptorii celulari şi mecanismele de transducţie a semnalului

Scridon Alina

Celulele sunt capabile să recepţioneze, să răspundă şi să integreze o multitudine de semnale provenite din mediul înconjurător, în vederea producerii răspunsului celular adecvat. Cu toate că unele dintre aceste semnale sunt transmise prin contactul direct dintre celulele învecinate, la nivelul organismelor pluricelulare majoritatea moleculelor semnal, precum hormonii, sunt sintetizate la distanţă de locul lor de acţiune şi ulterior sunt transportate prin torentul sanguin până la structurile receptoare. Semnalele astfel declanşate sunt recepţionate şi procesate de mecanismele celulare de transducţie a semnalului, alcătuite din receptori specifici, elemente efectorii şi proteine reglatorii.

Receptorii sunt componente ale celulelor organismului, molecule proteice specializate, situate la nivelul membranelor celulare, care interacţionează specific cu substanţe endogene (hormoni, neurotransmiţători, agenţi terapeutici) sau cu droguri administrate exogen, declanşând un lanţ de procese biochimice care au ca rezultat final producerea efectului celular corespunzător. Acest proces poartă numele de transducţie a semnalului (procesul prin care semnalul extern este transformat în răspuns). Până în prezent au fost identificate sute de tipuri de receptori şi cu siguranţă există încă mulţi alţii care nu au fost încă descrişi.

Existenţa receptorilor membranari a fost presupusă cu mult înainte de descoperirea unor dovezi în acest sens, ca urmare a observaţiilor unor cercetători asupra specificităţii chimice şi fiziologice a unor agenţi terapeutici. Prima dovadă a existenţei acestora provine de la fiziologul englez Langley (1889), care a descris mecanismul de acţiune al nicotinei asupra ganglionilor nervoşi. Acesta a observat efectul stimulator şi ulterior inhibitor al nicotinei asupra unor organe inervate de nervii postganglionari, prin activarea şi apoi blocarea joncţiunilor interneurale la nivel ganglionar. Ehrlich a observat că anumiţi agenţi organici sintetici prezintă efecte antiparazitare, în timp ce alţi agenţi nu au acelaşi efect, cu toate că diferenţele dintre structurile lor chimice sunt minore, iar Langley, în cadrul cercetărilor sale, a observat că alcaloidul *curara* nu previne contracţia musculară stimulată electric, dar blochează contracţia stimulată de nicotină.

Pornind de la aceste începuturi simple, receptorii au devenit un punct central al cercetărilor, în special în legătură cu efectele unor agenţi terapeutici şi mecanismele lor de acţiune. Conceptul de receptor, extins în domeniul endocrinologiei, imunologiei şi biologiei moleculare, s-a dovedit a fi un element esenţial pentru a putea explica multe procese de reglare biologică. Receptorii diferitelor substanţe farmacologic active sunt descrişi în prezent ca macromolecule, deschizând calea pentru înţelegerea bazelor moleculare ale acţiunii acestor droguri.

Cercetările realizate pe parcursul ultimelor trei decade au descris destul de detaliat procesele moleculare implicate în transducţia semnalelor extracelulare în mesaje intracelulare, care controlează funcţiile celulare.

În majoritatea cazurilor, transducţia transmembranară a semnalului se realizează printr-o gamă destul de restrânsă de mecanisme moleculare distincte. Fiecare dintre aceste mecanisme s-a adaptat,

prin evoluţia unor familii distincte de proteine, la transducţia unui număr mare de semnale de natură diferită. Aceste familii de proteine cuprind receptorii de pe suprafaţa şi din interiorul celulelor, ca şi o serie de enzime şi alte componente care generează, amplifică, coordonează şi încheie transducţia postreceptor a semnalului prin intermediul mesagerilor secunzi aflaţi în citoplasma celulelor.

Patru mecanisme de bază implicate în transducţia transmembranară a semnalului sunt în prezent bine înţelese. Fiecare dintre aceste patru mecanisme utilizează o strategie diferită pentru ca ligandul să poată străbate bariera reprezentată de dublul strat lipidic al membranei plasmatice. Aceste mecanisme sunt:

- utilizarea unui ligand liposolubil pentru a străbate membrana şi pentru a acţiona asupra receptorului situat intracelular;
- folosirea unui receptor proteic de la suprafaţa celulei, a cărui activitate enzimatică intracelulară este reglată allosteric prin legarea ligandului de un situs al domeniului extracelular al proteinei;
- utilizarea unui canal ligand-dependent, de fapt un canal ionic transmembranar, care poate fi influenţat să se deschidă sau să se închidă prin ataşarea ligandului;
- folosirea unui receptor proteic transmembranar pentru a stimula o proteină de transducţie a semnalului legată de GTP (proteina G), care generează în continuare un mesager secund intracelular.

14.1 Receptorii celulari

Cel mai frecvent activarea receptorilor se face prin ataşarea la aceştia a unor hormoni endogeni.

Hormonii sunt mesageri biochimici care integrează răspunsul unor celule individuale în ansamblul acţiunilor organismului. În general, aceştia sunt sintetizaţi de ţesuturi specifice şi secretaţi direct în sânge, prin intermediul căruia sunt transportaţi la organele ţintă. E suficientă doar o cantitate mică din aceşti hormoni pentru a modifica funcţia unei celule. Hormonii îşi îndeplinesc funcţia lor biologică prin interacţiunea cu receptori specifici situaţi la nivelul celulei ţintă, fie intracelular, fie asociaţi membranei celulare, ducând la activarea mecanismului de transducţie a semnalului şi în final la un răspuns celular specific. O celulă poate deţine mai mulţi receptori care interacţionează cu un acelaşi hormon şi astfel pot fi declanşate diverse căi de transducţie a semnalului, sau dimpotrivă, hormoni diferiţi pot activa aceeaşi cale biochimică.

Un receptor este alcătuit din cel puţin două structuri esenţiale: un situs de recunoaştere a hormonului, la care acesta se ataşează (situsul de legare) şi un situs efector, unde are loc primul răspuns care modifică funcţia celulară. Între cele două situsuri are loc procesul de transducţie a semnalului, sau de cuplare. După cuplare, situsul efector suferă modificări allosterice, astfel încât să se producă răspunsul.

Hormonii pot fi grosier clasificaţi în hormoni steroizi şi hormoni polipeptidici (proteici). Pentru mulţi hormoni, inclusiv pentru majoritatea hormonilor de natură proteică, receptorul este o structură ancorată în membrana plasmatică, la suprafaţa celulei. Interacţiunea dintre hormon şi receptor declanşează în general o cascadă de evenimente la nivelul citoplasmei, precum fosforilarea sau defosforilarea unor proteine citoplasmatice, modificarea permeabilităţii canalelor ionice sau creşterea concentraţiei intracelulare a unor substanţe care pot funcţiona ca mesageri secunzi. Unii hormoni proteici acţionează direct la nivelul receptorilor dispuşi în citoplasmă sau la nivelul nucleului. Pentru hormonii steroizi, receptorii sunt localizaţi intracelular, în citoplasma celulei ţintă, iar pentru a fi activaţi hormonii trebuie să străbată membrana celulară.

14.1.1 Receptorii intracelulari – receptorii hormonilor steroizi

În torentul sanguin, hormonii steroizi circulă legaţi de o largă varietate de proteine transportoare (albumina realizează legături destul de slabe cu o serie de hormoni steroizi). În plus, pentru aceşti hormoni există şi o serie de globuline transportoare specifice. Cea mai mare parte a hormonilor steroizi circulă în plasmă legată de proteine transportoare şi doar o mică fracţiune se află în stare liberă sau nelegată. Această ultimă fracţiune este considerată fracţiunea activă la nivelul celulelor ţintă. Între cele două fracţiuni, liberă şi legată, există un permanent echilibru la nivelul fluidului extracelular. Un posibil rol al acestor proteine transportoare este acela de a realiza o distribuţie omogenă a hormonilor la nivelul celulelor ţintă, modulând fluctuaţiile largi ale hormonilor şi prelungind timpul de înjumătăţire al acestora în sânge.

Hormonii steroizi, precum cortizolul (sintetizat în cortexul suprarenalian), hormonii sexuali şi vitamina D, fiind molecule hidrofobe, pot traversa cu uşurinţă membrana plasmatică a celulei pentru a iniţia răspunsul prin intermediul receptorilor hor-

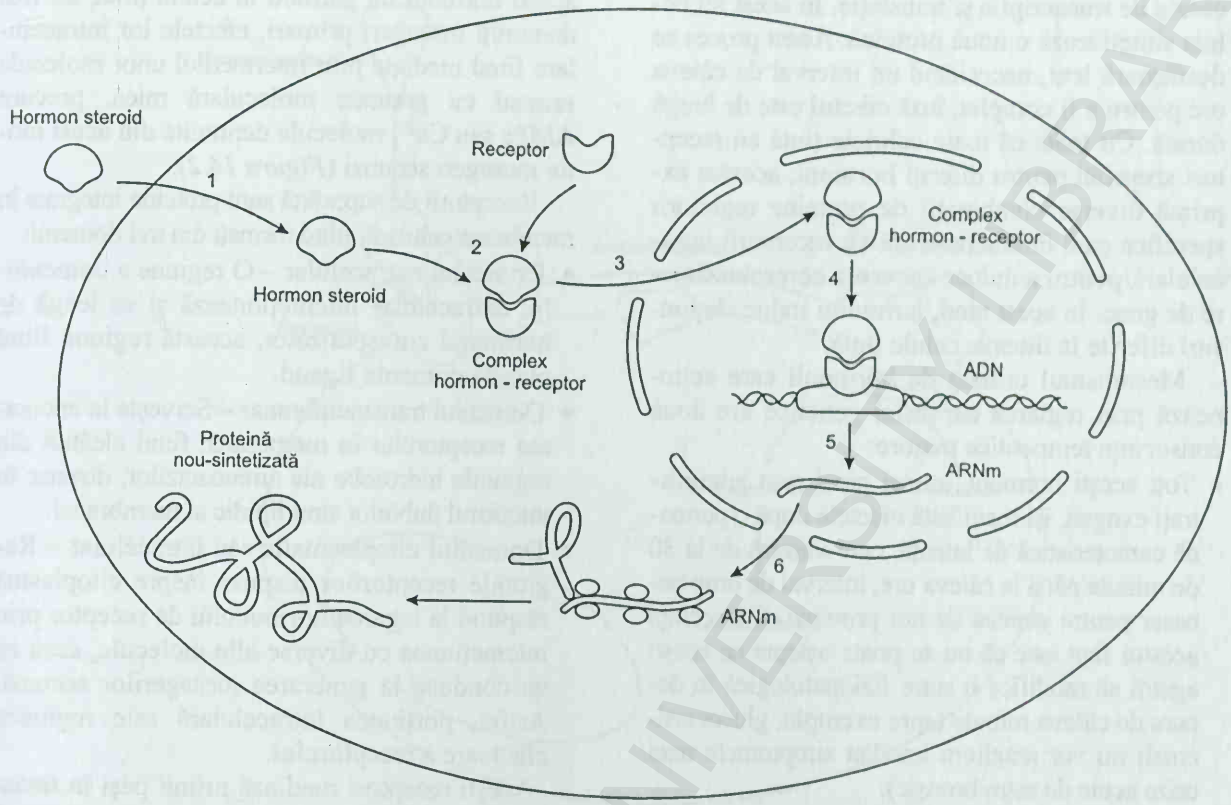


Figura 14.1. Etapele transformării în răspuns intracelular a semnalului purtat de hormonii steroizi, tiroidieni şi retinoizi

monilor steroizi, localizaţi în citoplasmă. Aceşti receptori aparţin unei superfamilii de receptori citoplasmatici, la nivelul cărora se realizează şi transducţia semnalului produs de alte molecule semnal hidrofobe, precum hormonii tiroidieni şi retinoizii derivaţi din vitamina A (acidul retinoic).

Receptorii intracelulari ai acestor hormoni – steroizi, tiroidieni şi retinoizi – sunt factori de transcripţie. Aceştia se cuplează la nivelul citoplasmei cu hormonul corespunzător. Complexul hormon-receptor pătrunde ulterior în nucleu şi se fixează pe anumite situsuri reglatorii de la nivelul ADN, responsabile de hormonul respectiv (*Figura 14.1*).

Receptorii acestor hormoni stimulează transcripţia genetică la nivelul nucleului prin legarea de secvenţe ADN specifice, aflate în vecinătatea genei a cărei expresie urmează să fie reglată. Pentru unii dintre aceşti receptori legarea ligandului reglează şi localizarea celulară. Astfel, receptorul pentru glucocorticoizi rămâne în citoplasmă până în momentul legării cu molecula ligand, după care se deplasează spre nucleu. Pe de altă parte, receptorii pentru estrogeni şi pentru hormonii tiroidieni sunt localizaţi în nucleu, chiar în absenţa ligandului.

Mecanismele moleculare utilizate de aceşti receptori sunt binecunoscute. Multe dintre secvenţele ADN ţintă au fost identificate. Similitudinea structurală a acestor receptori sugerează faptul că toţi fac parte dintr-o familie de proteine care au evoluat dintr-un precursor comun. Studierea receptorilor prin tehnici de recombinare ADN a permis identificarea mecanismelor lor moleculare. Spre exemplu, deleţia situsului de legare a ligandului din structura receptorului pentru glucocorticoizi duce la formarea unei proteine trunchiate, cu afinitate mare pentru secvenţa ADN corespunzătoare, producând stimularea transcripţiei genetice, chiar în absenţa stimulării glucocorticoide. Această constatare sugerează faptul că legarea unui hormon steroid de receptorul corespunzător activează transcripţia prin eliberarea unui inhibitor. Mecanismul inhibitor este exercitat (în absenţa ligandului) de situsul de legare a ligandului din structura receptorului.

Fixarea complexului hormon-receptor de situsul reglator al ADN induce o modificare conformaţională a factorului de transcripţie, prin dislocarea unei proteine care inhibă expresia genetică a secvenţei ADN respective, astfel încât secvenţa respectivă va putea fi introdusă în pro-

cesele de transcripţie şi translaţie. În acest fel celula sintetizează o nouă proteină. Acest proces se desfăşoară lent, necesitând un interval de câteva ore pentru a fi complet, însă efectul este de lungă durată. Cu toate că toate celulele ţintă au receptori specifici pentru diferiţi hormoni, acestea exprimă diverse combinaţii de proteine reglatorii specifice care interacţionează cu receptorii intracelulari, pentru a induce secvenţa corespunzătoare de gene. În acest mod, hormonii induc răspunsuri diferite în diverse celule ţintă.

Mecanismul utilizat de hormonii care acţionează prin reglarea expresiei genetice are două consecinţe terapeutice majore:

- Toţi aceşti hormoni, atunci când sunt administraţi exogen, îşi manifestă efectele după o perioadă caracteristică de latenţă, care variază de la 30 de minute până la câteva ore, interval de timp necesar pentru sinteza de noi proteine. Consecinţa acestui fapt este că nu se poate aştepta ca aceşti agenţi să modifice o stare fiziopatologică în decurs de câteva minute (spre exemplu, glucocorticoizii nu vor ameliora imediat simptomele unei crize acute de astm bronşic).
- Efectele acestor agenţi pot persista timp de ore sau zile după ce concentraţia agonistului a fost redusă la zero. Persistenţa efectului se datorează în primul rând turnover-ului relativ lent al majorităţii enzimelor şi proteinelor, care pot rămâne active la nivelul celulei timp de ore sau chiar zile din momentul în care au fost sintetizate. Persistenţa se poate datora şi înaltei afinităţi a receptorului pentru hormonul respectiv, ceea ce va conduce la o disociere lentă a complexului hormon-receptor. Din punct de vedere terapeutic acest fenomen justifică faptul că efectele terapeutice (sau toxice) ale acestor hormoni descresc de obicei lent după încetarea administrării hormonului şi că nu există o corelaţie temporală liniară între concentraţia plasmatică a hormonului şi efectele sale.

14.1.2 Receptorii de suprafaţă – receptorii hormonilor polipeptidici

Termenul de hormoni polipeptidici reuneşte o gamă largă de hormoni, factori de creştere şi citokine, care au în comun faptul că utilizează sisteme transmembranare de transducţie a semnalului pentru a-şi putea exercita efectele biologice. Spre deosebire de hormonii steroizi, hormonii polipeptidici nu pot traversa membranele şi îşi vor iniţia efectul asupra celulelor ţintă prin acţiunea la nivelul receptorilor de la suprafaţa celulei. Întrucât aceşti hormoni nu pătrund în celula ţintă, au fost denumiţi mesageri primari, efectele lor intracelulare fiind mediate prin intermediul unor molecule semnal cu greutate moleculară mică, precum AMPc sau Ca^{2+}, molecule denumite din acest motiv mesageri secunzi (*Figura 14.2*).

Receptorii de suprafaţă sunt proteine integrate în membrana celulară, fiind formaţi din trei domenii:

- Domeniul extracelular – O regiune a domeniului extracelular interacţionează şi se leagă de hormonul corespunzător, această regiune fiind numită domeniu ligand.
- Domeniul transmembranar – Serveşte la ancorarea receptorului în membrană, fiind alcătuit din regiunile hidrofobe ale aminoacizilor, dispuse în interiorul dublului strat lipidic al membranei.
- Domeniul citoplasmatic sau intracelular – Regiunile receptorilor dispuse înspre citoplasmă răspund la legarea hormonului de receptor prin interacţiunea cu diverse alte molecule, ceea ce va conduce la generarea mesagerilor secunzi. Astfel, porţiunea intracelulară este regiunea efectoare a receptorului.

Aceşti receptori mediază primii paşi în transducţia semnalului insulinei, factorului epidermal de creştere (EGF), factorului de creştere derivat plachetar (PDGF) şi altor câtorva hormoni trofici. Au fost identificate o serie de variaţii în structura receptorilor de suprafaţă. Majoritatea receptorilor pentru factorii de creştere au o structură simplă, traversând membrana o singură dată, cu toate că uneori, pentru transducţia eficientă a semnalului, pot fi necesari receptori cu structură dimerică. Alţi receptori, cum este receptorul pentru insulină, au mai multe subunităţi.

Fiecare dintre aceste căi de transducţie a semnalului începe prin activarea allosterică, indusă de legarea ligandului de receptor, a proteinei tirozinkinază, localizată la nivelul domeniului citoplasmatic al receptorului proteic. Aceşti receptori aparţin unei familii mari de proteine tirozinkinazice din care fac parte şi o serie de kinaze citoplasmatice, ca şi produşii unor oncogene virale. Când un ligand se leagă de aceşti receptori, se declanşează autofosforilarea reziduurilor de tirozină de la nivelul domeniului citoplasmatic al receptorului. Această autofosforilare poate intensifica sau prelungi durata activării allosterice induse de ligand. Spre exemplu, activitatea tirozinkinazică a receptorului de insulină autofosforilat persistă şi după ce insulina a fost îndepărtată de la nivelul situsului de legare.

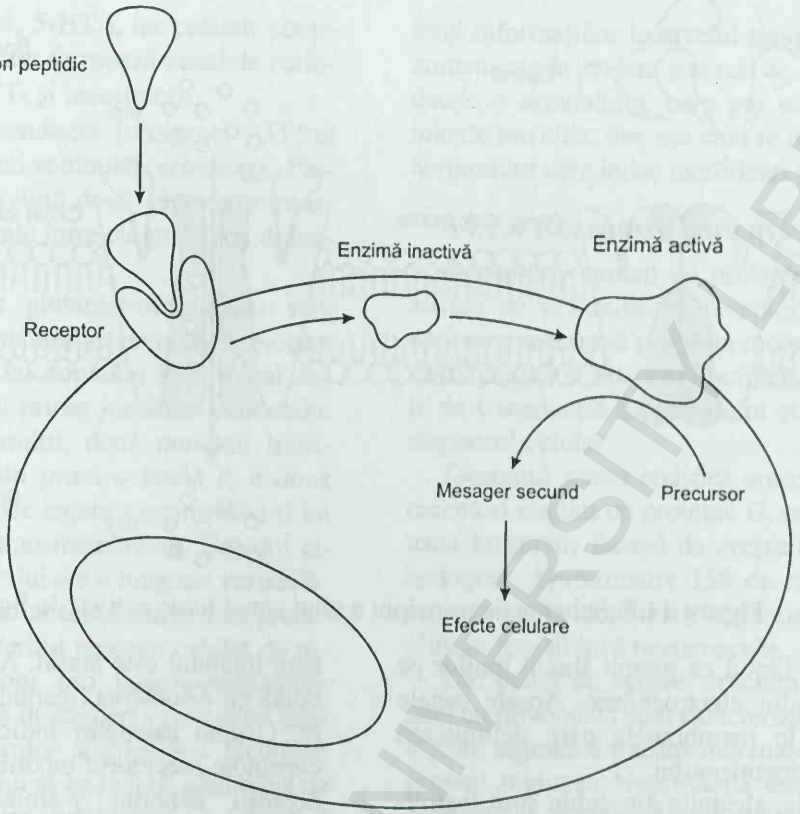


Figura 14.2. Etapele transformării în răspuns intracelular a semnalului purtat de hormonii peptidici

Calea de transducţie a semnalului declanşată de aceşti receptori este una complexă. Insulina, spre exemplu, se pare că utilizează o singură clasă de receptori atât pentru a declanşa creşterea captării glucozei şi aminoacizilor cât şi pentru a regla metabolismul glicogenului şi trigliceridelor la nivelul celulelor. În mod similar, fiecare dintre factorii de creştere iniţiază la nivelul celulelor ţintă un complex de evenimente mergând de la modificarea capacităţii de transport a membranei pentru protoni, ioni şi metaboliţi până la modificări caracteristice în expresia unor gene. Unele dintre aceste răspunsuri implică fosforilarea indusă de serinkinaze sau treoninkinaze, în timp ce altele funcţionează pe baza factorilor de transcripţie, care pot fi ei înşişi substratul activităţii kinazice.

Intensitatea şi durata acţiunii EGF, PDGF şi a altor agenţi care acţionează prin intermediul acestei clase de receptori sunt limitate de fenomenul de *downregulation*. Legarea ligandului de receptor accelerează procesul de endocitoză al receptorilor de la suprafaţa celulei, urmată de degradarea acestor receptori (şi a ligandului). Atunci când acest proces se produce cu o rată mai mare decât sinteza *de novo* a receptorilor, numărul total al receptorilor scade, iar capacitatea de răspuns a celulei la ligandul corespunzător este în consecinţă redusă. La fel ca alte răspunsuri celulare la liganzi, care activează aceşti receptori, *downregulation* ligand-indusă necesită activitatea tirozinkinazică a receptorului, astfel că ea nu poate avea loc la nivelul celulelor ale căror receptori au suferit mutaţii care anulează activitatea tirozinkinazică.

14.1.3 Canalele ionice ligand-dependente

Ipoteza existenţei canalelor ionice a fost emisă de biofizicienii britanici Alan Hodgkin şi Andrew Huxley, care au şi primit premiul Nobel pentru teoria asupra impulsurilor nervoase în 1952. Existenţa acestora a fost confirmată în anii 1970 prin tehnica "patch clamp", care le-a adus cercetătorilor Erwin Neher şi Bert Sakmann premiul Nobel. Un număr mare de cercetători continuă să caute o descriere mai detaliată a modului de acţiune al acestor proteine.

Canalele ionice sunt proteine membranare a căror funcţie este de a facilita difuziunea ionilor prin membranele biologice. Acestea sunt reprezentate de pori alcătuiţi din proteine, care ajută la stabilirea şi controlul gradientelor electrice de o parte şi de cealaltă a membranei plasmatice a

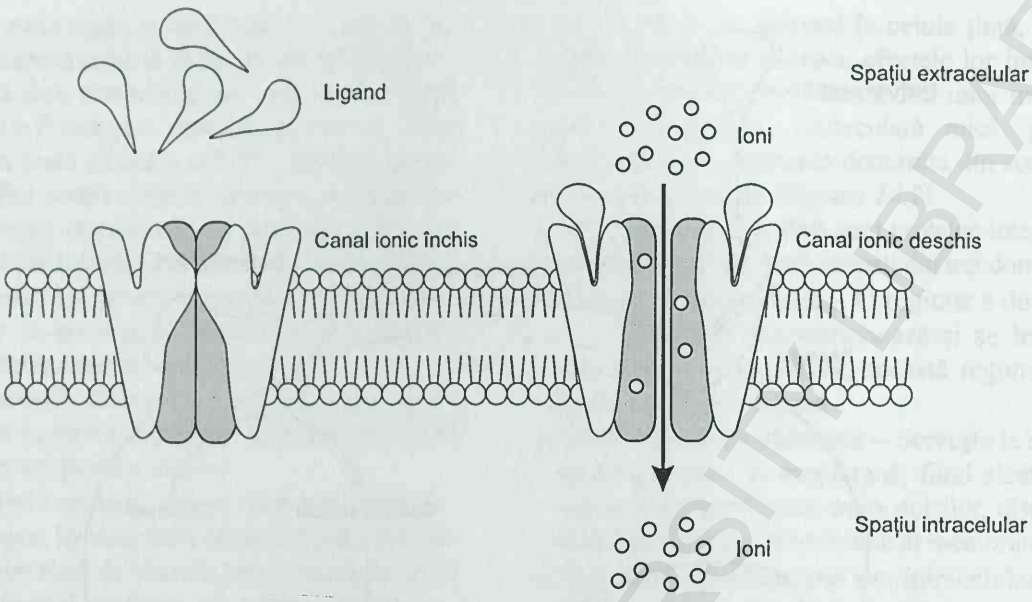


Figura 14.3. Schema de principiu a unui canal ionic activat de liganzi

celulelor, prin faptul că permit fluxul ionilor pe baza gradientului electrochimic. Aceste canale sunt dispuse în membranele care delimitează toate celulele organismului.

Membranele, alcătuite din dublu strat fosfolipidic, reprezintă o barieră hidrofobă dielectrică în calea moleculelor hidrofile şi a celor încărcate electric. Acestea funcţionează ca izolatori electrici. Canalele ionice asigură căi hidrofile, bune conductoare, la nivelul membranei hidrofobe. Canalul catalizează transportul moleculelor încărcate electric prin acest mediu dielectric.

Canalele ionice diferă între ele în funcţie de ionii al căror pasaj îl permit, de modul în care pot fi reglate, de numărul de subunităţi din care sunt alcătuite, precum şi de alte aspecte structurale.

În funcţie de mecanismul chimic sau fizic care le controlează starea de activitate, se descriu:

- Canale ionice activate de liganzi;
- Canale ionice transmembranare voltaj-dependente;
- Canale ionice dependente de mesageri secunzi;
- Canale ionice mecanosensibile;
- Joncţiuni *gap*.

Majoritatea canalelor ionice fac parte din două categorii mari: canale ionice activate de liganzi şi canale ionice transmembranare voltaj-dependente.

Canalele ionice activate de liganzi suferă modificări conformaţionale în urma fixării unui ligand extracelular (*Figura 14.3*). Această modificare conformaţională permite deschiderea porului ionic, însă canalul se poate deschide şi închide de mai multe ori pe parcursul perioadei în care ligandul este ataşat. Această stare va înceta odată cu disocierea ligandului de situsul de legare. Grupul canalelor ionice activate de liganzi cuprinde: receptorul nicotinic al acetilcolinei, receptorii acidului γ-aminobutiric $GABA_A$ şi $GABA_C$, receptorul glicinei, receptorii glutamatului ionotropic şi receptorii ATP2X.

Multe dintre drogurile cu largă utilitate clinică îşi realizează efectele prin mimarea sau prin blocarea efectelor unor liganzi endogeni care reglează fluxul ionic prin canalele membranelor plasmatice. Liganzii naturali includ acetilcolina, acidul γ-aminobutiric şi aminoacizii cu efect excitant (glicina, aspartatul, glutamatul etc.). Toţi aceşti agenţi sunt transmiţători sinaptici.

Sunt descrise trei superfamilii diferite de subunităţi ale canalelor ionice activate de liganzi extracelulari:

- Receptorii superfamiliei cys-loop (receptorii nicotinici, receptorii $5\text{-}HT_3$, receptorii $GABA_A$ şi $GABA_C$, receptorii glicinei şi unele canale anionice activate de glutamat, histamină şi serotonină). Aceşti receptori sunt alcătuiţi din cinci subunităţi omoloage. Fiecare subunitate conţine o regiune N-terminală extracelulară şi patru segmente transmembranare. Bucla localizată între subunităţile transmembranare trei şi patru alcătuieşte domeniul intracelular, de lungime variabilă. Subunităţile superfamiliei cys-loop sunt distribuite în două grupuri, unul conţinând subunităţile care formează canalele anionice (receptori $GABA_A$ şi $GABA_C$, glicină,

glutamat, histamină, 5-HT_1), iar celălalt conţinând subunităţile care formează canalele cationice (receptori 5-HT_3 şi nicotinici).

- Canalele ATP-dependente (receptori ATP2x) sunt alcătuite din trei subunităţi omoloage. Fiecare subunitate prezintă două segmente transmembranare, separate între ele printr-un domeniu extracelular.
- Canalele cationice glutamat-dependente sunt alcătuite din patru subunităţi omoloage. Fiecare subunitate conţine un domeniu N-terminal extracelular, urmat de prima jumătate a situsului de legare a agonistului, două domenii transmembranare separate printr-o buclă P, a doua jumătate a situsului de legare a agonistului şi un al treilea segment transmembranar. Capătul citoplasmatic al canalului are o lungime variabilă.

Receptorul nicotinic al acetilcolinei este probabil cel mai bine caracterizat receptor celular de suprafaţă pentru hormoni sau neurotransmiţători. Acetilcolina determină deschiderea canalelor ionice la nivelul receptorului acetilcolinic nicotinic, care va permite Na^+-ului să îşi reducă gradientul de concentraţie intracelular, producând un potenţial postsinaptic excitator localizat – o depolarizare.

Structura receptorului nicotinic al acetilcolinei a fost descrisă cu ajutorul microscopiei crioelectronice, la o rezoluţie de 0,9nm. Acest receptor are o structură pentamerică, fiind format din 5 subunităţi polipeptidice (două lanţuri α, unul β, unul γ şi unul δ, toate cu greutăţi moleculare cuprinse între 43.000 şi 50.000 Da). Aceste polipeptide, fiecare traversând dublul strat lipidic de mai multe ori, sunt aşezate circular în jurul unui orificiu central cu diametrul de 80Å, care asigură calea de acces a ionilor la nivelul membranei celulare postsinaptice. Atunci când acetilcolina se fixează de situsurile subunităţii α se produce o modificare conformaţională care va conduce la deschiderea tranzitorie a canalului central apos, prin care ionii de Na^+ penetrează din fluidul extracelular în interiorul celulei. Receptorul fixează două molecule de acetilcolină. Legarea dintre cele două situsuri de legare ale acetilcolinei şi canalul ionic se face printr-un mecanism allosteric, întrucât legarea ligandului determină modificări structurale la distanţă de situsul de legare.

Intervalul de timp scurs din momentul legării ligandului de canalul ionic şi până la producerea efectului celular poate fi măsurat în milisecunde. Rapiditatea acestui mecanism de transducţie a semnalului este extrem de importantă pentru transferul informaţiilor la nivelul sinapselor. Acest fenomen este în evident contrast cu alte căi de transducţie a semnalului, care pot necesita secunde, minute sau chiar ore, aşa cum se întâmplă în cazul hormonilor care induc modificări genetice.

14.1.4 Receptorii cuplaţi cu proteine G

Receptorii cuplaţi cu proteine G sunt reprezentaţi de o familie de receptori transmembranari care sesizează prezenţa moleculelor în exteriorul celulei şi activează în interiorul celulei căile de transducţie a semnalului şi, în consecinţă, răspunsul celular.

Genomul uman codifică aproximativ 350 de receptori cuplaţi cu proteine G, capabili de a detecta hormoni, factori de creştere şi alţi liganzi endogeni. Aproximativ 150 de receptori cuplaţi cu proteine G identificaţi în genomul uman îndeplinesc funcţii încă necunoscute.

Din punct de vedere structural receptorii cuplaţi cu proteine G sunt caracterizaţi prin prezenţa a şapte segmente transmembranare. Aceştia au în general regiunea N-terminală dispusă în spaţiul extracelular, α-helixuri care străbat membrana de şapte ori (cu 20-28 de aminoacizi hidrofobi fiecare), trei spire extracelulare şi trei intracelulare şi o regiune C-terminală intracelulară. Regiunile transmembranare ale acestor receptori îşi conservă aceeaşi secvenţă de aminoacizi după ce străbat membrana, reflectând probabil un mecanism comun pentru modificarea conformaţională declanşată de ataşarea ligandului (*Figura 14.4).*

Regiunile extracelulare conţin şi două reziduuri de cisteină, bine conservate, între care se formează legături disulfide, care stabilizează structura receptorului. Prima structură a receptorilor umani cuplaţi cu proteine G a fost descrisă în 2007. Acelaşi receptor (de fapt un receptor β_2-adrenergic) a fost imediat descris cu o mai mare fidelitate.

Mecanismul de transducţie a semnalului realizat de aceşti receptori nu este pe deplin cunoscut. În majoritatea cazurilor activarea acestei căi de transducţie a semnalului se desfăşoară în trei etape. Mai întâi ligandul extracelular este detectat de receptorul celular de suprafaţă. Ca şi consecinţă, receptorul declanşează activarea unei proteine G localizate pe suprafaţa citoplasmatică a membranei celulare. Proteina G activată modifică apoi activitatea unui element efector, de obicei o enzimă sau un canal ionic. La rândul său, acest element modifică concentraţia intracelulară a unui mesager secund. Pentru AMPc de exem-

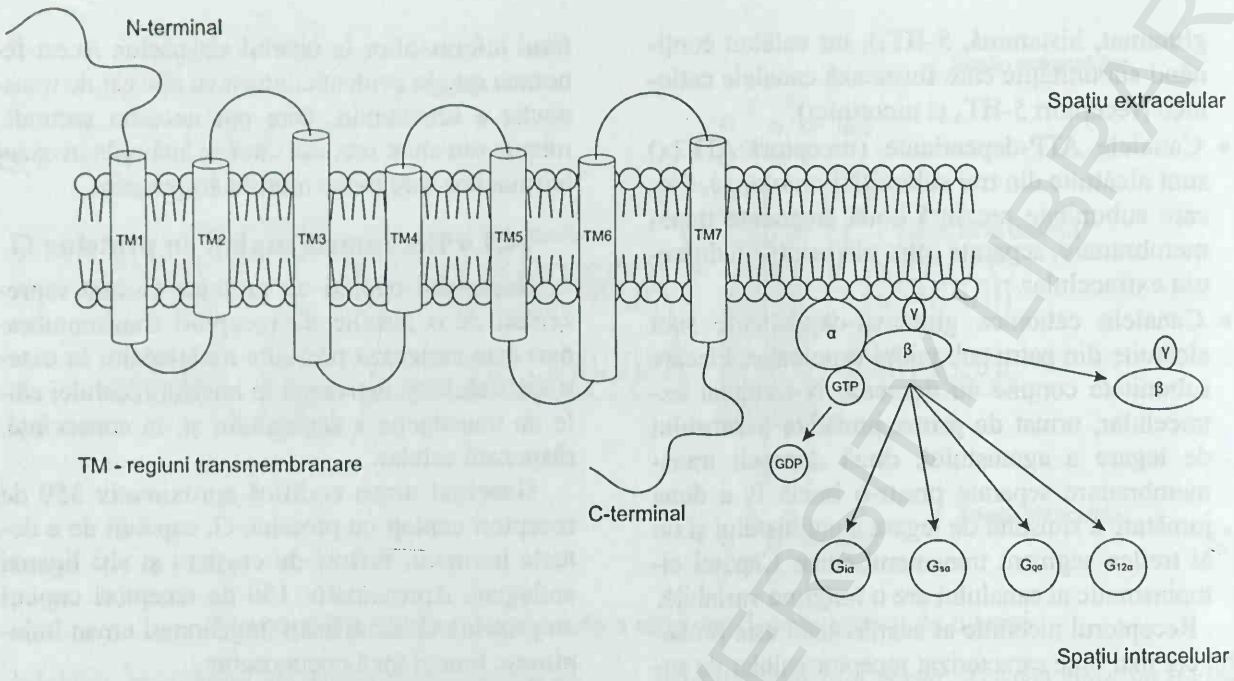


Figura 14.4. Mecanismul transducţiei semnalului transmis de receptorii cuplaţi cu proteinele G

plu, enzima efectoare este adenilat ciclaza, o proteină transmembranară care converteşte ATP-ul intracelular în AMPc. Proteina G corespunzătoare stimulează adenilat ciclaza, după ce aceasta a fost la rândul ei activată de un hormon sau de un neurotransmiţător, fiecare dintre aceştia acţionând asupra unui receptor specific.

Se consideră că receptorul se găseşte într-o stare de echilibru între stările biofizice activă şi inactivă. Legarea ligandului poate trece receptorul la forma sa activă. Sunt descrişi trei tipuri de liganzi:

- Agonişti – liganzi care trec receptorul la forma sa activă;
- Agonişti inverşi – liganzi care trec receptorul la forma sa inactivă;
- Antagonişti neutri – liganzi care nu afectează echilibrul dintre stările activă şi inactivă.

Aceşti receptori răspund la o gamă largă de agonişti precum fotoni, amine, hormoni, neurotransmiţători şi proteine. Unii dintre aceşti agonişti se leagă de buclele extracelulare ale receptorului, altele pot penetra până la regiunea transmembranară. Molecule ligand precum epinefrina se leagă în mod tipic de receptorul cuplat cu proteina G prin aşezarea într-un "buzunăraş" format de cele şapte helixuri transmembranare. Receptorii cuplaţi cu proteine G nu au domenii catalitice intrinseci şi de aceea recrutează proteine de legare guanin-nucleotid (proteinele G) prin intermediul celei de-a treia bucle citoplasmatice.

Receptorii cuplaţi cu proteine G sunt implicaţi într-un număr mare de procese fiziologice, precum: simţul vizual, simţul olfactiv, reglarea comportamentului şi a dispoziţiei, reglarea activităţii sistemului imun şi a inflamaţiei, transmiterea în cadrul sistemului nervos autonom.

Este cunoscut faptul că proteina G inactivă este legată de receptorul aflat în stare inactivă. Odată ligandul recunoscut, receptorul îşi modifică conformaţia şi astfel activează mecanic proteina G, care se detaşează de receptor. Atunci când este activat de către ligand, receptorul devine un excelent substrat pentru fosforilarea reziduurilor de serină şi treonină din vecinătatea capătului C-terminal. Această modificare dezactivează (desensibilizează) receptorul prin creşterea afinităţii sale pentru proteine citoplasmatice desensibilizante care intră în competiţie cu şi previn activarea proteinelor G. Spre deosebire de downregularea receptorilor, desensibilizarea este reversibilă relativ rapid prin defosforilarea receptorului şi disocierea sa de proteinele desensibilizante. În această formă receptorul poate activa o altă proteină G sau poate trece din nou în forma inactivă.

Desensibilizarea receptorilor cuplaţi cu proteine G se produce prin expunerea prelungită a acestora la molecule ligand. Sunt descrise două tipuri de desensibilizare:

- Desensibilizare homologă – prin care receptorii cuplaţi cu proteine G activaţi suferă fenomenul de *downregulation*.

- Desensibilizare heterologă – prin care receptorii cuplaţi cu proteine G activaţi determină desensibilizarea altor receptori cuplaţi cu proteine G. Reacţia cheie în cadrul acestei desensibilizări este fosforilarea domeniului intracelular (citoplasmatic) de către proteinkinaze.

14.1.4.1 Proteinele G

Proteinele G au fost descoperite de Alfred Gilman şi Martin Rotbell, care au investigat stimularea celulară prin adrenalină. Aceştia au observat că atunci când un hormon precum adrenalina se leagă de un receptor, receptorul nu stimulează direct enzime precum adenilat ciclaza. În schimb, receptorul stimulează o proteină G, care la rândul său stimulează producerea de către adenilat ciclază a mesagerului secund AMPc. Pentru această descoperire cei doi cercetători au primit, în 1994, premiul Nobel.

Alternând între statusul inactiv de guanozindifosfat (GDP) şi cel activ gunozintrifosfat (GTP), proteinele G alcătuiesc un grup de molecule implicate în reglarea unei game vaste de procese biologice, inclusiv transducţia şi transcripţia semnalului, sinteza proteică, traficul intracelular şi exocitoza, contractilitatea şi secreţia, la fel ca şi mobilitatea, creşterea, proliferarea şi diferenţierea celulară.

Proteinele G sunt elemente implicate în transducţia semnalului unui număr mare de hormoni, neurotransmiţători, chemokine, factori autocrini şi paracrini. Semnalul extracelular este recepţionat de membrii unei mari familii de receptori cu şapte regiuni transmembranare care activează proteinele G. Aceste căi interacţionează pentru a forma o vastă reţea ce reglează enzimele metabolice, canalele ionice, transportori şi alte componente ale aparatului celular, care controlează la rândul lor o gamă largă de procese celulare precum dezvoltarea embrionară, dezvoltarea gonadelor, procesele de învăţare şi memorie şi homeostazia organismului.

De fapt, afecţiuni precum diabetul zaharat, cecitatea, alergiile, depresia, o serie de afecţiuni cardiovasculare şi diverse forme de cancer, alături de alte afecţiuni, sunt considerate a fi consecinţe ale unor defecte în mecanismele de transducţie a semnalului în care sunt implicate proteinele G.

Familia proteinelor G este alcătuită în special din două subfamilii distincte de proteine. Proteinele G heterotrimerice, numite şi proteine G mari, sunt activate de către receptorii cuplaţi cu proteinele G. Acestea reglează transducţia transmembranară a semnalului de la receptorii de suprafaţă la o serie de efectori intracelulari, precum adenilat ciclaza, fosfolipaza C, GMPc fosfodiesteraza şi sistemele efectoare legate de canalele ionice. Aceste proteine G sunt alcătuite din trei clase distincte de subunităţi: α (39-46kDa), β (37kDa) şi γ (8kDa). În general, specificitatea este dată de subunitatea α, la nivelul căreia se găseşte situsul de legare al GTP şi care are activitate intrinsecă GTP-azică. Cu toate acestea, este acceptat în prezent faptul că şi subunităţile βγ pot regla direct activitatea unor efectori precum fosfolipaza A_2, izoformele β ale fosfolipazei C, adenilat ciclaza şi canalele ionice. Proteinele G heterotrimerice reglează transmiterea transmembranară a semnalelor prin funcţionarea ca molecule comutator, legând receptorii de suprafaţă cuplaţi cu proteinele G cu una sau mai multe molecule semnal subsecvente. Sunt descrise şi proteine G mici (20-25kDa), care aparţin superfamiliei de GTP-aze *Ras*.

Patru mari subfamilii ale subunităţii α au fost identificate pe baza omologiei ADNc şi a funcţiei lor: G_s, G_i, G_q şi G_{12}.

- Subunitatea G_s - stimulează producerea de AMPc din ATP. Acest mecanism se realizează prin stimularea directă a enzimei adenilat ciclază asociată membranei. AMPc acţionează ca mesager secund, care interacţionează cu şi activează proteinkinaza A. În continuare proteinkinaza A poate fosforila o serie întreagă de ţinte subsecvente.
- Subunitatea G_i - inhibă producerea AMPc din ATP prin inhibarea adenilat ciclazei. Proteinele G_i mediază la rândul lor stimularea sistemului de mesageri secunzi fosfoinozitide şi reglarea canalelor de K^+ şi Ca^{2+}.
- Subunitatea G_q - stimulează fosfolipaza C ataşată membranei, care clivează ulterior fosfoinozitolul în doi mesageri secunzi – inozitol-trifosfat şi diacilglicerol.
- Subunitatea G_{12} - controlează remodelarea citoscheletului celular, reglând astfel migrarea celulară.

Subunităţile βγ au uneori funcţii active, precum cuplarea la canalele de Ca^{2+} de tip L.

Proteinele G_s şi alte tipuri de proteine G utilizează un mecanism molecular care se bazează pe legarea şi hidroliza GTP. Legarea receptorului iniţiază interacţiunea cu proteina G heterotrimerică GDP-dependentă, aflată în stare inactivă, inducând modificarea conformaţională a receptorului, care îi

permite acestuia să funcţioneze ca un factor de schimb guanin-nucleotid, ducând la conversia GDP în GTP la nivelul subunităţii α. Această modificare va duce la scăderea afinităţii subunităţii α atât pentru receptor cât şi pentru subunităţile βγ, având drept consecinţă disocierea complexului receptor – proteină G. Subunitatea Gα activată (GTP-dependentă), subunităţile βγ eliberate, sau ambele, pot interacţiona în aceste condiţii cu unul sau mai mulţi efectori pentru a genera mediatori secunzi intracelulari, care vor activa cascadele semnal subsecvente, în timp ce receptorul este capabil să activeze o altă proteină G.

Un neurotransmiţător precum norepinefrina poate avea o interacţiune extrem de scurtă cu receptorul său, de doar câteva milisecunde. Cu toate acestea, durata activării adenilat ciclazei depinde de longevitatea legăturii dintre GTP şi proteina G_s, mai degrabă decât de afinitatea receptorului pentru norepinefrină. Astfel, în mod caracteristic, proteina G_s rămâne activă un interval de timp de zeci de secunde, fapt care duce la amplificarea marcată a semnalului iniţial. Cu toate că este necesară o singură moleculă de ligand pentru a activa legarea GTP de una dintre proteinele G, hidroliza lentă a GTP face ca proteina G activată să persiste mult timp după disocierea de molecula de agonist. Transmiterea semnalului este întreruptă prin activitatea GTP-azică a subunităţii α, care hidrolizează GTP-ul la GDP, permiţând refacerea formei inactive heterotrimerice a proteinei G (Gαβγ).

14.1.5 Receptorii agenţilor terapeutici

În urmă cu nu mai mult de 40 de ani, structura chimică a receptorilor specifici pentru diverse droguri şi chiar existenţa acestora, a putut fi doar bănuită pe baza structurii chimice a drogurilor. În prezent, receptorii corespunzători multor droguri au fost purificaţi şi caracterizaţi. Majoritatea acestor receptori sunt de natură proteică, posibil pentru că structura polipeptidică asigură atât necesitatea diversităţii cât şi specificităţii legate de formă şi sarcină electrică.

Cel mai bine caracterizaţi receptori ai agenţilor terapeutici sunt proteinele reglatorii, care mediază acţiunea moleculelor semnal endogene, precum neurotransmiţători sau hormoni. Această clasă de receptori mediază efectele unui număr mare dintre cele mai utilizate droguri.

Alte clase de proteine care au fost identificate şi descrise ca receptori ai agenţilor terapeutici includ enzimele, a căror activitate poate fi inhibată, sau mai frecvent activată, prin legarea unor agenţi terapeutici (spre exemplu dihidrofolatreductaza sau receptorul agentului antineoplazic metotrexat), proteine transportoare (spre exemplu ATP-aza Na^+/K^+-dependentă sau receptorul membranar al glicozizilor digitalici) şi proteine structurale (spre exemplu tubulina sau receptorul colchicinei, un agent antiinflamator).

Liganzii se fixează pe regiuni moleculare specifice, numite situsuri de recunoaştere, de la nivelul macromoleculei receptorului. Situsul de legare al unui drog poate coincide sau poate fi diferit de situsul de legare al unor liganzi endogeni (hormoni sau neurotransmiţători). Agoniştii care se fixează pe un situs adiacent sau pe un alt situs al receptorului se numesc agonişti allosterici. Se poate produce şi legarea nespecifică a unui drog – la nivelul unor situsuri care nu erau destinate drogului respectiv, spre exemplu legarea de proteinele plasmatice. Legarea agenţilor terapeutici de astfel de situsuri nespecifice împiedică legarea drogului de receptor, inactivându-l. Drogurile care circulă nelegate sunt disponibile legării de receptor şi capabile de a-şi exercita efectul.

Capacitatea agentului de a se lega de receptor este influenţată de factori externi, ca şi de mecanismele reglatorii intracelulare. Densitatea iniţială a receptorilor şi eficienţa mecanismelor stimul-efect variază de la un ţesut la altul. Agenţii terapeutici, înaintarea în vârstă, mutaţiile genetice şi diverse disfuncţii pot creşte (fenomen de *upregulation*) sau descreşte (*downregulation*) numărul şi afinitatea receptorilor. Spre exemplu, clonidina determină un fenomen de downregulation asupra receptorilor α_2-adrenergici. Astfel, întreruperea bruscă a tratamentului cu clonidină poate cauza crize hipertensive. Terapia de lungă durată cu β-blocante upregulează densitatea receptorilor β-adrenergici. Astfel, întreruperea bruscă a acestor agenţi poate duce la hipertensiune severă şi tahicardie. Reglarea receptorilor prin fenomene de *upregulation* şi *downregulation* afectează adaptarea la droguri prin procese de desensibilizare, tahifilaxie, toleranţă, rezistenţă dobândită, supersensibilitate postretragere.

Capacitatea de acţiune a unui agent terapeutic este legată de afinitatea sa (probabilitatea ca un drog să se fixeze de receptorul corespunzător la un moment dat) şi activitatea sa intrinsecă (proporţia în care un ligand activează receptorul şi declanşează un răspuns celular). Afinitatea şi activitatea unui drog sunt determinate de structura sa chimică.

Marea majoritate a agenţilor terapeutici prezintă o corelaţie extrem de importantă a structurii şi specificităţii în ceea ce priveşte producerea efectelor. Datele experimentale au evidenţiat faptul că agenţii terapeutici interacţionează cu situsurile de fixare ale receptorilor localizate la nivelul unor macromolecule cu proprietăţi proteinlike şi structuri tridimensionale. Modificări minime în structura moleculară a agentului terapeutic sunt suficiente pentru a produce modificări majore ale specificităţii lor.

Trei aspecte ale funcţiei receptorilor agenţilor terapeutici sunt în mod special importante. Ele vor fi descrise în continuare în ordinea crescătoare a complexităţii lor. Primul aspect este funcţia acestor receptori ca determinanţi ai relaţiei cantitative dintre concentraţia drogului şi răspunsul farmacologic pe care îl produce. Din acest punct de vedere, receptorii sunt structuri simple, caracterizate în primul rând prin afinitatea lor de a se lega de drogurile ligand şi de abundenţa lor la nivelul celulelor şi ţesuturilor ţintă. Al doilea aspect este reprezentat de funcţia lor de proteine reglatorii şi de componente ale mecanismelor semnal, care furnizează ţinte pentru diverşi agenţi terapeutici. Pentru a explica acest aspect, receptorii sunt consideraţi molecule complexe, ale căror structuri şi funcţii biochimice ajută la explicarea elementelor cheie ale relaţiei doză-efect, ca şi selectivitatea lor farmacologică. Al treilea aspect este reprezentat de funcţia lor cheie în producerea efectelor terapeutice şi respectiv toxice. La un nivel atât de ridicat de complexitate se discută despre rolul central pe care receptorii îl joacă în determinarea selectivităţii drogurilor, relaţia dintre doză şi efectele pe care aceasta le produce, precum şi de utilitatea terapeutică a unui agent farmacologic (spre exemplu eficacitate terapeutică *versus* toxicitate).

Pentru a putea aprecia pe deplin utilitatea receptorilor proteici ca ţinte ale agenţilor terapeutici trebuie să înţelegem un alt concept deosebit de important al mecanismului de acţiune al acestor droguri. Receptorii proteici sunt în primul rând destinaţi recunoaşterii liganzilor endogeni, care, după legarea de receptorul corespunzător, îşi manifestă efectul. Aceşti liganzi poartă numele de agonişti. În multe cazuri, se poate sconta pe utilitatea agoniştilor administraţi exogen. Spre exemplu, la pacienţii diabetici, metabolismul energetic poate fi controlat prin injectarea de insulină recombinată pentru a suplimenta nivelurile endogene reduse. La pacienţii astmatici tulburările respiratorii pot fi ameliorate prin administrarea inhalatorie a β_2-agoniştilor, care vor induce relaxarea muşchilor netezi ai căilor aeriene. Aceşti agenţi se vor fixa şi ulterior vor activa receptorii β_2 (activaţi în mod normal de noradrenalină) de la nivelul celulelor musculare netede şi vor produce în acest mod relaxarea musculaturii netede contractate datorită acţiunii unor agenţi endogeni (histamină, leucotriene etc.), eliberate ca urmare a mecanismelor fiziopatologice implicate în astm. Prin stimularea receptorilor β_2-adrenergici, efectul moleculelor semnal endogene este contrabalansat. Acest principiu de acţiune al agenţilor terapeutici poartă numele de antagonsim fiziologic.

Conceptul de antagonism fiziologic este deosebit de important pentru mecanismul de acţiune al agenţilor terapeutici, dar nu la fel de important ca un alt mecanism de contracarare a efectelor moleculelor semnal endogene, mai direct, şi anume utilizarea receptorilor antagonişti. Se ştie că anumiţi liganzi nu îşi produc efectele prin interaţiune directă cu receptorii proteici, ci acţionează ca agonişti parţiali. În fapt, aceşti liganzi pot inhiba efectele moleculelor semnal endogene prin simpla legare de receptorii proteici corespunzători. Acest concept poate fi cu uşurinţă înţeles dacă se are în vedere principiul interacţiunii ligand-receptor de tip "lacăt şi cheie". Doar liganzii care îndeplinesc toate criteriile pentru a se potrivi la receptor pot produce efectul. Unele substanţe se pot potrivi profilului, dar nu în totalitate. Astfel, ele nu vor fi capabile de a declanşa efectul dar, prin legarea de receptor, blochează molecula iniţială să se fixeze de receptor şi să-şi manifeste efectul. Acest concept este deosebit de important, fiind un principiu frecvent utilizat pentru manifestarea efectelor agenţilor terapeutici. Spre exemplu, pentru a preveni bronhoconstricţia la pacienţii astmatici se poate administra un agent care previne acţiunea moleculelor semnal endogene capabile de a produce bronhoconstricţie – antagonişti de histamină sau leucotriene.

14.1.6 Receptorii de rezervă

Eficienţa relativă a mecanismelor de transducţie a semnalului este parţial determinată de modificarea conformaţională iniţială a receptorului şi de evenimentele biochimice implicate din momentul legării moleculei de receptor şi până la producerea răspunsului celular.

Înalta eficienţă a interacţiunii receptor-efector poate fi interpretată şi ca rezultat al existenţei re-

ceptorilor de rezervă. Vorbim despre receptori de rezervă atunci când răspunsul maximal poate fi produs de către o substanţă a cărei concentraţie nu asigură ocuparea întregului set de receptori disponibili. Receptorii de rezervă nu diferă din punct de vedere calitativ de restul receptorilor. Aceştia nu sunt ascunşi sau indisponibili, iar atunci când sunt ocupaţi sunt capabili de a produce răspunsul celular.

Conceptul de receptor de rezervă poate ajuta la explicarea faptului că sensibilitatea unei celule sau a unui ţesut la o anumită concentraţie a substanţei active nu depinde doar de afinitatea receptorului pentru agonist, ci şi de concentraţia totală a receptorului. Dacă un ţesut posedă un procent de 90% receptori de rezervă, iar concentraţia receptorilor este de 100 receptori *per* celulă şi dacă răspunsul se află în relaţie liniară cu gradul de ocupare al receptorilor, pentru producerea răspunsului maximal va fi necesară ocuparea a 10 receptori (10%), iar pentru producerea a 50% din răspunsul maximal va fi necesară o concentraţie a substanţei care asigură ocuparea a 5%, respectiv a 5 receptori *per* celulă. Dacă concentraţia receptorilor este dublată la 200 receptori *per* celulă, pentru producerea răspunsului maximal va fi necesară ocuparea tot a 10 receptori *per* celulă, iar pentru obţinerea a 50% din răspunsul maximal ocuparea tot a 5 receptori *per* celulă. În acest caz însă vorbim despre 5 receptori din 200, deci doar 2,5% din totalitatea receptorilor. Întrucât afinitatea receptorului nu s-a modificat, o concentraţie mai mică de substanţă va fi suficientă pentru a ocupa mai degrabă 2,5% decât 5% dintre receptori, iar valoarea a 50% din răspunsul maximal va fi astfel mai mică. Astfel, este posibilă modificarea sensibilităţii unui ţesut care posedă receptori de rezervă prin modificarea concentraţiei receptorului.

O consecinţă biologică importantă a prezenţei receptorilor de rezervă este faptul că aceştia permit substanţei active cu afinitate scăzută pentru receptori să producă un răspuns complet, la concentraţii reduse. Acest mecanism este important întrucât liganzii cu afinitate scăzută disociază rapid de receptori, permiţând terminarea rapidă a răspunsurilor biologice. Pe de altă parte, legarea cu afinitate mare a liganzilor de receptori ar fi urmată de o disociere lentă a agonistului de receptor şi în consecinţă la terminarea lentă a răspunsului biologic.

Afinitatea receptorului pentru hormon este definită ca şi concentraţia la care jumătate dintre receptori sunt ocupaţi de hormoni. Întrucât răspunsul este proporţional cu numărul de receptori activaţi şi care pot produce astfel un răspuns biochimic, consecinţa este aceea că celulele care exprimă receptori de rezervă sunt mai sensibile la hormon decât ar indica gradul de afinitate.

Într-o serie de circumstanţe, celulele îşi pot creşte sau scădea numărul de receptori funcţionali pe care îi exprimă. Fenomenele de *upregulation* şi *downregulation* se pot realiza prin ajustarea ratelor relative de sinteză şi degradare a receptorilor, prin endocitoza şi sechestrarea receptorilor, sau modificarea lor covalentă prin fosforilare şi respectiv defosforilare. Modificările uşoare în numărul receptorilor au consecinţe minime în prezenţa unui număr mare de receptori de rezervă, dar pot fi foarte importante pentru celulele care nu exprimă receptori de rezervă. Este mult mai obişnuit ca celulele să-şi ajusteze numărul de receptori decât ca receptorul să îşi modifice afinitatea faţă de hormoni.

În mod experimental, prezenţa receptorilor de rezervă poate fi demonstrată prin utilizarea antagoniştilor necompetitivi, care previn legarea agonistului la o parte din receptorii disponibili, dovedind faptul că o concentraţie înaltă de agonist poate produce şi în aceste condiţii un răspuns maximal. Astfel, un răspuns inotropic maxim al muşchiului cardiac sub acţiunea catecolaminelor poate fi produs chiar în condiţiile în care până la 90% dintre receptorii β-adrenergici sunt blocaţi de către un antagonist.

14.2 Mecanisme semnal receptor-independente

Cu toate că majoritatea moleculelor semnal extracelulare îşi mediază acţiunea la nivelul celulei ţintă prin interacţiunea cu receptori de suprafaţă sau citoplasmatici, o serie de molecule semnal cu greutate moleculară mică au posibilitatea de a traversa direct membrana celulară şi de a modifica activitatea catalitică a regiunilor transmembranară sau citoplasmatică a enzimelor cu rol în transducţia semnalului. Acesta este şi cazul oxidului nitric (NO).

Oxidul nitric este un gaz diatomic hidrofob sintetizat în diferite celule ale organismului, care joacă un rol esenţial ca moleculă semnal, un mesager biologic esenţial în organismele vertebratelor, jucând un rol cheie într-o serie de procese biologice. NO, cunoscut ca şi factorul de relaxare derivat endotelial (EDRF), este sintetizat endogen din arginină şi oxigen, sub acţiunea unor en-

zime numite nitric oxid sintaze (NOS), precum şi prin reducerea nitratului anorganic.

Acesta este unul dintre puţinele molecule semnal cunoscute aflate sub formă gazoasă. Sistemele de transducţie a semnalului în care este implicat NO sunt importante în special la nivel cerebral şi la nivelul sistemului cardiovascular.

Endoteliul vascular utilizează NO pentru a realiza relaxarea musculaturii netede adiacente, determinând astfel vasodilataţia şi creşterea fluxului sanguin local. NO este înalt reactiv, având un timp de înjumătăţire de câteva secunde şi care difuzează liber prin membrane. Aceste caracteristici fac ca NO să fie o moleculă semnal ideală pentru mecanisme paracrine şi autocrine.

Transmiterea semnalului de către o substanţă gazoasă, sintetizată de o celulă, care penetrează membranele şi reglează funcţiile altor celule este un principiu cu totul inedit în cadrul organismului uman.

Au fost descrise o serie de mecanisme prin care NO influenţează biologia celulară. Aceste funcţii sunt iniţiate de legarea NO de ioni de metale din structura unor proteine sau de atomi de sulf, ca cei din structura cisteinei. În ambele situaţii, această legare declanşează modificări allosterice ale proteinelor, care, la rândul lor, declanşează formarea mesagerilor secunzi. Aceste modificări includ oxidarea proteinelor care conţin fier precum ribonucleotid reductaza sau aconitaza, activarea guanilatciclazei solubile, ribozilarea ADP, nitrozilarea grupărilor sulfhidril proteice şi activarea factorului reglator al fierului. Ţinta cea mai comună a NO pare a fi guanilatciclaza, o enzimă heterodimerică, cu formarea consecutivă a GMPc. GMPc activează în continuare proteinkinaza G, care va determina fosforilarea, şi astfel inactivarea kinazei lanţului uşor al miozinei, ducând în final la defosforilarea lanţurilor uşoare de miozină şi astfel la relaxarea muşchilor netezi.

Mecanismul prin care nitroglicerina are efect vasodilatator este conversia acesteia în oxid nitric. O serie de agenţi terapeutici (Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil) amplifică efectele NO prin inhibarea enzimei care degradează GMPc.

14.3 Mesagerii secunzi

Mesagerii secunzi sunt molecule cu localizare intracelulară implicate în transmiterea semnalului de la receptori la structurile ţintă. Termenul de mesageri secunzi este folosit pentru a diferenţia aceste molecule de hormoni sau de alte structuri care acţionează la nivelul spaţiului extracelular ca mesageri primari în vederea transmiterii informaţiei biologice. Majoritatea moleculelor de mesageri secunzi sunt de dimensiuni mici şi de aceea au capacitatea de a difuza rapid în citoplasmă, asigurând astfel transmiterea rapidă a informaţiei în interiorul celulei. Ca şi componente ale căilor de transmitere a semnalului, mesagerii secunzi participă la integrarea informaţiei, sinteza şi degradarea lor fiind sub influenţa unor factori externi. În plus, mesagerii secunzi pot avea un număr mare de structuri ţintă, realizând în acest mod expansiunea semnalului iniţial.

Un număr mare de liganzi extracelulari îşi manifestă acţiunea prin intermediul creşterii concentraţiilor intracelulare de mesageri secunzi precum AMPc, ioni de Ca^{2+} sau fosfoinozitide.

În cadrul fiziologiei celulare, sistemele de mesageri secunzi reprezintă o metodă de transducţie a semnalului prin intermediul căreia o moleculă semnal difuzibilă este rapid produsă/secretată, putând ulterior activa o proteină efectoare aflată în interiorul celulei, în vederea declanşării răspunsului celular.

Sunt descrise trei tipuri majore de mesageri secunzi:

- Molecule hidrofobe – molecule insolubile în apă, precum diacilglicerolul sau fosfatidilinozitolul, molecule asociate membranelor celulare care difuzează prin membrana plasmatică în spaţiul intermembranar, unde pot interacţiona şi pot activa proteinele efectorii.
- Molecule hidrofile – molecule solubile în apă, precum AMPc, GMPc, IP_3 sau Ca^{2+}, localizate în citosol.
- Molecule gazoase – precum NO sau monoxidul de carbon (CO), care pot difuza prin citosol şi prin membranele celulare.

Aceste molecule, deşi având proprietăţi distincte, au câteva caracteristici comune, şi anume:

- Pot fi sintetizate şi degradate prin reacţii specifice în care sunt implicate enzime sau canale ionice.
- Unele, precum Ca^{2+}, pot fi stocate în organite celulare specializate şi ulterior rapid eliberate, dacă necesităţile organismului o cer.

Un număr mare de mesageri secunzi sunt în prezent binecunoscuţi, incluzând nucleotidele ciclice (adenozin monofosfatul ciclic - AMPc şi guanozin monofosfatul ciclic - GMPc), o serie de ioni (Ca^{2+}), molecule derivate din fosfolipide (inozitoltrifosfat) şi chiar molecule gazoase (NO).

Sistemele de mesageri secunzi pot fi activate pe diverse căi, fie prin activarea unor enzime care

conduc ulterior la sinteza acestora, ca în cazul activării kinazelor, care duc la sinteza nucleotidelor ciclice, fie prin deschiderea canalelor ionice pentru a permite influxul unor ioni de metale, precum Ca^{2+}. Aceste molecule îşi pot desfăşura în continuare acţiunea prin fixarea şi activarea altor molecule, precum proteinkinazele, canalele ionice sau o gamă largă de alte proteine, contribuind astfel la desfăşurarea cascadei de transducţie a semnalului.

Ionul de Ca^{2+} joacă un rol major în răspunsurile rapide ale neuronilor şi celulelor musculare. În repaus, celulele menţin o concentraţie citoplasmatică redusă a calciului, consumând energie pentru a pompa acest ion din celulă. După activare, neuronii şi celulele musculare îşi cresc rapid concentraţia citoplasmatică de Ca^{2+} prin deschiderea canalelor membranare, care permit ionilor de Ca^{2+} din spaţiul extracelular să pătrundă rapid în spaţiul intracelular.

Cu toate acestea, aceste modele probabil că nu funcţionează pentru toate mecanismele de transducţie. Exemple de sisteme mult mai complexe sunt cele care includ cascada acidului arahidonic şi NO.

14.3.1 Adenozin monofosfatul ciclic (AMPc)

AMPc a fost primul mesager secund identificat. Un număr mare de studii din ultimii 30 de ani au arătat rolul fundamental al acestuia în răspunsul celular la numeroşi hormoni şi neurotransmiţători. Deşi componentele cele mai importante în calea mediată de AMPc sunt binecunoscute, au fost identificate recent noi elemente importante, care au elucidat în continuare reglarea complexă şi încrucişările extensive între aceasta şi alte căi de transducţie a semnalului. Nivelul intracelular de AMPc este determinat de balanţa dintre activitatea a două tipuri de enzime: adenilat ciclază şi fosfodiesteraze. Ambele enzime sunt codate de un număr mare de gene, care diferă în ceea ce priveşte *pattern*-urile de expresie şi mecanismele de reglare. La mamifere există nouă tipuri diferite de adenilat ciclază, iar degradarea AMPc este reglată de cel puţin 12 membrii diferiţi din marea familie a fosfodiesterazelor.

Funcţionând ca un mesager secund intracelular, AMPc mediază răspunsuri hormonale precum mobilizarea energiei stocate (degradarea carbohidraţilor în ficat sau a trigliceridelor în celulele adipoase stimulate de catecolaminele β-adrenomimetice), conservarea apei de către rinichi (mediată de vasopresină), homeostazia calciului (reglată de hormonul paratiroidian) sau creşterea frecvenţei si forţei de contracţie a miocardului (prin catecolaminele β-adrenomimetice). Acesta reglează, de asemenea, sinteza hormonilor steroizi (ca răspuns la corticotropină sau la hormonul foliculostimulant), relaxarea muşchilor netezi şi multe alte procese endocrine şi nervoase.

AMPc şi kinazele dependente de acesta intervin în câteva procese biochimice, cum ar fi reglarea metabolismului glucidic şi lipidic.

Epinefrina (receptorii β-adrenergici), glucagonul, hormonul luteinizant (LH), hormonul adrenocorticotrop (ACTH), gonadotropina corionică, hormonul foliculostimulant (FSH), histamina (receptorii H_2), hormonul melanocito-stimulator, hormonul paratiroidian, prostaciclina, prostaglandina E_1, serotonina (receptorii 5-HT_1), hormonul tireotrop (TSH) şi vasopresina (receptorii V_1) sunt hormoni care îşi exercită efectele prin intermediul mesagerului secund AMPc.

AMPc se sintetizează din ATP cu ajutorul enzimei adenilat ciclază, localizată în membranele celulare (*Figura 14.5*). Adenilat ciclaza este activată de o serie de molecule semnal prin stimularea receptorilor cuplaţi cu proteine G_s şi este inhibată de agonişti ai receptorilor cuplaţi cu proteine G_i. Adenilat ciclaza hepatică răspunde mult mai puternic la glucagon, comparativ cu adenilat ciclaza musculară, care răspunde mai puternic la adrenalină.

Reacţia de ciclizare implică interacţiunea dintre gruparea 3'-OH a unităţii riboză cu gruparea α-fosforil a ATP, cu formarea unei legături fosfodiester, produsă prin hidroliza subsecventă a pirofosfatului eliberat. Creşterea AMPc declanşează răspunsul celular corespunzător prin schimbarea activităţii moleculare în citosol, frecvent prin intermediul proteinkinazei A, o proteinkinază AMPc-dependentă care fosforilează proteinele ţintă, prin activarea unei noi căi de transcripţie genetică sau ambele.

AMPc este în mod normal inactiv, ca o holoenzimă tetramerică formată din două subunităţi catalitice şi două reglatorii (C_2R_2), unităţile reglatorii blocând centrul catalitic al unităţilor catalitice. AMPc se leagă de situsuri specifice ale subunităţilor reglatoare ale proteinkinazelor şi determină disocierea subunităţilor reglatoare de cele catalitice, aceasta ducând la activarea subunităţilor catalitice şi permiţând acestora să fosforileze proteinele substrat.

Subunităţile activate catalizează transferul fosfatului din ATP pe reziduuri specifice de serină sau treonină ale proteinelor substrat. Proteinkinaza A poate, de asemenea, să fosforileze proteine specifice care se leagă de regiuni promotoare ale

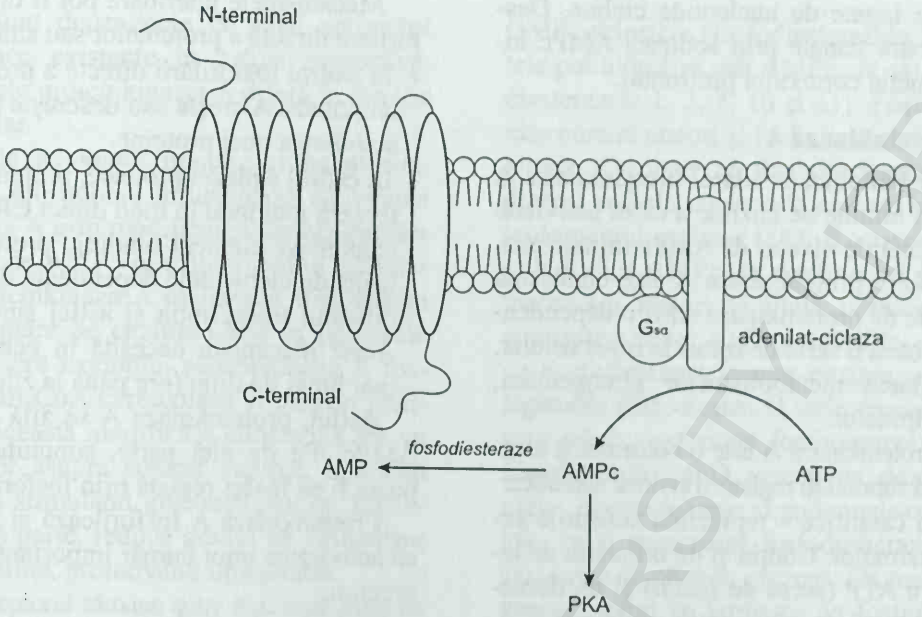


Figura 14.5. Generarea AMPc ca urmare a activării adenilat ciclazei de către proteinele Gs

ADN, cauzând creşterea expresiei unor gene specifice. Nu toate proteinkinazele răspund la AMPc. Câteva tipuri de proteinkinaze nu sunt AMPc-dependente, cum ar fi de exemplu proteinkinaza C.

Specificitatea efectelor reglatoare ale AMPc se datorează acţiunii kinazelor asupra unor substraturi proteice distincte, exprimate la nivelul diverselor celule. Spre exemplu ficatul este bogat în fosforilazkinază şi glicogensintază, enzime a căror reglare reciprocă prin fosforilarea AMPc-dependentă reglează depozitarea şi eliberarea carbohidraţilor; adipocitele sunt bogate în lipaze, a căror fosforilare AMPc-dependentă mediază eliberarea acizilor graşi liberi din celulele adipoase.

Întrucât fiecare moleculă de hormon poate stimula mai multe subunităţi α ale G_s, acest model de transducţie transmembranară a semnalului amplifică semnalul iniţial. Cu toate că hidroliza GTP de către GTP-aza intrinsecă a subunităţii α a G_s are rolul de a dezactiva adenilat ciclaza, complexul hormon-receptor trebuie să fie, de asemenea, dezactivat pentru ca celula să se poată întoarce la starea iniţială, de repaus. Desensibilizarea receptorului, care se produce după expunerea prelungită la hormonul respectiv, implică fosforilarea capătului C-terminal al receptorului β-adrenergic cuplat cu hormonul, de către o kinază, cunoscută sub numele de kinaza receptorului β-adrenergic. Receptorii cuplaţi cu proteinele G, precum receptorii α-adrenergici, care acţionează prin inhibarea generării de AMPc, sunt cuplaţi cu activitatea de inhibare a adenilat ciclazei, prin intermediul proteinelor G_i.

Activitatea AMPc este întreruptă de hidroliza AMPc la 5'-AMP de către fosfodiesterazele AMPc-specifice. Inhibarea competitivă a degradării AMPc este unul dintre mecanismele prin care cafeina, teofilina şi alte metilxantine îşi produc efectele.

Hormonul β-adrenergic epinefrină intervine în descompunerea glicogenului la glucoză la nivelul muşchilor şi într-o proporţie mai mică şi la nivelul ficatului. La nivelul ficatului însă, descompunerea glicogenului la glucoză este dictată în special de hormonul polipeptidic glucagon, secretat de pancreas în condiţii de hipoglicemie. Unul dintre efectele cele mai precoce produse de legarea acestor hormoni de receptorii corespunzători este generarea de AMPc, o moleculă de mici dimensiuni, care joacă un rol cheie în reglarea transducţiei intracelulare a semnalului, având drept rezultat conversia glicogenului în glucoză. Importanţa AMPc în reglarea degradării glicogenului a fost demonstrată printr-o serie de experimente care au evidenţiat nu doar că hormonii care activează adenilat ciclaza în celulele adipoase stimulează descompunerea glicogenului ci şi că analogii AMPc, precum dibutiril-AMPc pot mima efectele acestor hormoni şi pot induce degradarea glicogenului.

Unele cercetări au sugerat că dereglarea căilor AMPc şi o activare aberantă a genelor controlate de acesta sunt legate de dezvoltarea anumitor tipuri de neoplazii. Există, de asemenea, date care indică faptul că AMPc intervine în funcţia gândirii complexe din cortexul prefrontal prin intermediul canalelor ionice activate de hi-

perpolarizare legate de nucleotide ciclice. Deschiderea acestor canale prin acţiunea AMPc interferă cu funcţia cortexului prefrontal.

14.3.1.1 Proteinkinaza A

În cadrul biologiei celulare, proteinkinaza A se referă la o familie de enzime a căror activitate este dependentă de nivelul de AMPc intracelular. Din acest motiv proteinkinaza A este cunoscută şi sub numele de proteinkinază AMPc-dependentă. Aceasta joacă o serie de roluri la nivel celular, precum reglarea metabolismelor glicogenului, glucozei şi lipidelor.

Fiecare proteinkinază A este o holoenzimă alcătuită din două subunităţi reglatorii şi două catalitice:

- Subunităţi catalitice – reprezintă situsurile active ale enzimelor. Conţin şi un domeniu de legare pentru ATP (sursa de fosfat) şi un domeniu care se leagă de subunităţile reglatorii.
- Subunităţile reglatorii – două molecule legate între ele, cu orientare antiparalelă, formând un homodimer. Aceste subunităţi au şi două domenii de legare cu AMPc, un domeniu prin care interacţionează cu subunităţile catalitice şi un domeniu autoinhibitor care serveşte ca substrat sau pseudosubstrat pentru subunităţile catalitice. Subunităţile reglatorii au şi activitate biologică diferită de rolul pe care îl îndeplinesc în modularea activităţii subunităţilor catalitice.

Subunităţile reglatorii există în două forme majore, RI şi RII, fiecare având două subtipuri – α şi β. Fiecare dintre cele patru izotipuri este codificată de o altă genă. Diferitele izotipuri au tendinţa de a se distribui diferit la nivelul celulelor şi ţesuturilor. Astfel, tipul I se găseşte în citoplasmă, în timp ce tipul II are tendinţa de a se asocia membranelor celulare. În plus au fost identificate trei izotipuri ale subunităţilor catalitice (α, β şi γ).

La concentraţii scăzute de AMPc holoenzima rămâne intactă şi este inactivă din punct de vedere catalitic. Când concentraţiile de AMPc cresc, acesta se leagă de cele două situsuri de legare de la nivelul subunităţilor reglatorii, ceea ce va duce la eliberarea subunităţilor catalitice.

Subunităţile catalitice libere pot astfel cataliza transferul grupărilor fosfat pe reziduurile de serină sau treonină. Această fosforilare determină modificarea activităţii substratului. Întrucât proteinkinazele A sunt prezente într-o largă varietate de celule şi acţionează pe diferite substraturi, proteinkinaza A şi AMPc sunt implicate într-un număr mare de mecanisme distincte.

Mecanismele ulterioare pot fi divizate în fosforilare directă a proteinelor sau sinteză proteică:

- În cadrul fosforilării directe a proteinelor, proteinkinaza A creşte sau descreşte în mod direct activitatea unei proteine.
- În cadrul sintezei proteice, proteinkinaza A activează mai întâi în mod direct CREB (c-AMP-responsive-element-binding protein), care se leagă de elementele dependente de AMPc, modificând transcripţia şi astfel sinteza proteică. Acest mecanism necesită în general perioade mai lungi de timp (ore până la zile).

Astfel, proteinkinaza A se află sub controlul AMPc. Pe de altă parte, subunitatea catalitică poate fi ea însăşi reglată prin fosforilare.

Proteinkinaza A fosforilează şi astfel modifică activitatea unui număr important de molecule, precum:

- Enzime – fosforilarea este un mecanism larg utilizat pentru activarea sau inactivarea unor enzime. Frecvent, enzima fosforilată este ea însăşi o kinază. Exemplul clasic este fosforilarea de către proteinkinaza A a enzimei fosforilazkinaza, care la rândul ei fosforilează glicogenfosforilaza, care duce la degradarea glicogenului în ficat şi muşchi. Implicarea unei cascade de transducţie a semnalului cu atât de multe etape duce la amplificarea semnalului iniţial în cadrul fiecărei etape a cascadei, asigurând faptul că legarea unei mici cantităţi de hormon duce la eliberarea unui număr mare de molecule de glucoză.
- Canalele ionice – o serie de canale de Ca^{2+} localizate la nivelul celulelor musculare cardiace sunt activate de către proteinkinaza A, declanşând contracţia musculară. Un alt exemplu important este acela că proteinkinaza A fosforilează şi astfel activează un canal de Cl^- important în secreţia apei la nivelul intestinului subţire.
- Proteinele cromozomale – histona H1 a fost prima ţintă identificată a proteinkinazei A.
- Factorii de transcripţie –odată fosforilaţi de proteinkinaza A, devin capabili de a se lega de regiunile promotor ale genelor şi de a stimula transcripţia.

Această scurtă listă oferă doar câteva exemple de situaţii în care proteinkinaza A joacă un rol esenţial în procese precum metabolismul energetic, contracţia musculară, transportul prin membrane şi expresia genetică.

Proteinkinaza A fosforilează diverse proteine, modificându-le funcţia. Proteinele disponibile

fosforilării sunt dependente de tipul activităţii proteinkinazice existente în celula respectivă. Astfel, efectele proteinkinazei A diferă în funcţie de tipul celular.

În celulele adipoase, miocite şi hepatocite, epinefrina şi glucagonul influenţează activitatea proteinkinazei A prin modificarea concentraţiilor intracelulare de AMPc prin intermediul adenilat ciclazei. Proteinkinaza A realizează fosforilarea unui număr mare de enzime cheie în procesele metabolice. Spre exemplu, proteinkinaza A fosforilează acetil-CoA carboxilaza şi piruvat dehidrogenaza. Această modificare allosterică are un efect inhibitor asupra acestor enzime, inhibând lipogeneza şi stimulând gluconeogeneza. Insulina, pe de altă parte, reduce gradul de fosforilare al acestor enzime, promovând lipogeneza.

Cu cât receptorul rămâne activ mai mult timp cu atât mai mare este cantitatea de kinază activată şi astfel un număr mai mare de receptori sunt fosforilaţi. La nivelul receptorilor β_2-adrenergici această fosforilare duce la trecerea proteinei G inactive la forma G_i. Fosforilarea mediată de proteinkinaza A AMPc-dependentă este cunoscută şi ca desensibilizare heterologă, nefiind specifică ligandului. De fapt, orice receptor care duce la creşterea activităţii proteinkinazei A va duce la amplificarea acestei desensibilizări la nivelul altor receptori cuplaţi cu proteine G (spre exemplu, activarea receptorului dopaminergic D_2 duce la desensibilzarea adrenoreceptorilor β_2).

14.3.1.2 Fosfodiesterazele

Istoria fosfodiesterazelor începe în 1886, odată cu descoperirile lui Hyde Salter. Acesta a observat că la un astmatic care bea o cantitate mică de cafea pe stomacul gol se produce ameliorarea dispneei, efect pe care l-a atribuit proprietăţilor bronhodilatatoare ale cafeinei. Cu toate că la vremea respectivă mecanismul de acţiune nu era încă cunoscut, s-a observat încă de atunci că acest agent acţionează ca un inhibitor neselectiv de fosfodiesterază. Începând de atunci, o serie de analogi ai cafeinei, inclusiv teofilina, au fost introduşi cu succes în tratamentul afecţiunilor căilor respiratorii.

Superfamilia fosfodiesterazelor este subîmpărţită în 11 familii, notate de la 1 la 11. Diverse fosfodiesteraze ale aceleiaşi familii sunt înrudite din punct de vedere funcţional, în ciuda faptului că secvenţa de aminoacizi poate fi considerabil diferită. Fosfodiesterazele au specificitate pentru diferite substraturi. Unele sunt hidrolaze AMPc-selective (fosfodiesterazele 4, 7 şi 8), altele sunt GMPc-selective (fosfodiesterazele 5, 6 şi 9). Altele pot hidroliza atât AMPc cât şi GMPc (fosfodiesterazele 1, 2, 3, 10 şi 11). Fosfodiesteraza 3 este numită uneori şi fosfodiesterază GMPc-inhibitorie. Cu toate că fosfodiesteraza 2 poate hidroliza ambele nucleotide ciclice, legarea GMPc la domeniul reglator GAF-B va creşte afinitatea şi hidroliza AMPc, în detrimentul GMPc. Acest mecanism, alături de altele, permite reglarea încrucişată a căilor AMPc- şi GMPc- dependente.

Fosfodiesterazele sunt enzime care scindează legăturile fosfodiester. O serie de enzime deţin, în sens tehnic, activitate fosfodiesterazică, inclusiv fosfolipazele C şi D, autotaxina, dezoxiribonucleazele, ribonucleazele şi endonucleazele de restricţie, ca şi numeroase fosfodiesteraze mici, puţin caracterizate până în prezent. Cu toate acestea, în general, când se vorbeşte de fosfodiesteraze, se face referire la fosfodiesterazele nucleotidelor ciclice, cu importanţă clinică deosebită.

Acestea reglează localizarea, durata şi amplitudinea efectelor nucleotidelor ciclice la nivelul domeniilor subcelulare. Astfel, fosfodiesterazele sunt factori reglatori importanţi ai căilor de transducţie a semnalului mediate de aceşti mesageri secunzi.

Fosfodiesterazele realizează ultima etapă a semnalului AMPc prin conversia AMPc în metabolitul său 5'AMP. În acest mod, fosfodiesterazele pot juca un rol cheie în reglarea diverselor răspunsuri fiziologice într-un număr mare de celule şi ţesuturi. S-a demonstrat rolul lor în reglarea activării plachetare, relaxării vasculare, contracţiei muşchiului cardiac şi inflamaţiei.

Multiplele forme (izoforme şi subtipuri) de fosfodiesteraze au fost izolate la începutul anilor 1970 prin electroforeza cu gel poliacrilamidă din creierul şobolanilor şi rapid după aceea au fost descoperiţi o serie de inhibitori selectivi. Potenţialul terapeutic al inhibitorilor selectivi de fosfodiesteraze a fost evidenţiat în 1977 de Weiss şi Hait.

Fosfodiesterazele sunt frecvent ţintele inhibiţiei farmacologice datorită distribuţiei tisulare unice, proprietăţilor structurale şi funcţionale.

Inhibitorii neselectivi de fosfodiesteraze, precum teofilina sau papaverina, au fost utilizaţi ca agenţi terapeutici pentru mai bine de 70 de ani într-o serie de afecţiuni. Cu toate acestea, abia în ultimii 10 ani au fost introduşi în practica clinică agenţi selectivi, utilitatea sildenafilului în tratamentul disfuncţiei erectile fiind dovada eficienţei acestor droguri. Eficacitatea inhibitorilor selectivi de fosfodiesteraze este evaluată în prezent în relaţie cu o serie de afecţiuni, in-

clusiv utilizarea inhibitorilor de fosfodiesterază 2 în tratamentul sepsisului, al inhibitorilor de fosfodiesterază 5 în tratamentul disfuncţiei sexuale la femei, bolilor cardiovasculare şi hipertensiunii pulmonare şi al inhibitorilor de fosfodiesterază 4 în tratamentul astmului bronşic, rinitei alergice, psoriazisului, sclerozei multiple, depresiei, bolii Alzheimer şi schizofreniei. Pe măsură ce cunoştinţele noastre în legătură cu mecanismele de acţiune ale acestor inhibitori selectivi de fosfodiesteraze se îmbogăţesc, în paralel cu dezvoltarea unor inhibitori cu selectivitate crescută, este de aşteptat să se identifice droguri cu acţiuni terapeutice superioare.

Fosfodiesterazele de tip 3 sunt prezente în special la nivelul miocardului. Inhibarea acestora duce la creşterea AMPc şi astfel la un efect inotrop pozitiv. Astfel de agenţi inhibitori sunt amrinona, milrinona şi enoximona. Aceştia cresc forţa de contracţie a muşchiului cardiac, probabil prin creşterea concentraţiei de AMPc şi stimularea proteinkinazei A, ducând la fosforilarea canalelor de Ca^{2+} la nivel cardiac, cu creşterea consecutivă a concentraţiei calciului intracelular. Utilizarea pe termen lung a acestor agenţi în tratamentul insuficienţei cardiace congestive s-a dovedit a fi neinspirată. Aceşti agenţi se utilizează doar în perfuzii intravenoase, pe perioade limitate de timp, pentru tratamentul insuficienţei miocardice acute. Pe lângă efectele cardiace, aceşti agenţi au şi proprietăţi vasodilatatoare şi bronhodilatatoare. Vesnarinona, pe lângă inhibarea fosfodiesterazelor, stimulează intrarea Na^+-ului în celulele miocardice şi inhibă producţia de citokine, părând să aibă un efect favorabil pe termen lung în tratamentul insuficienţei cardiace congestive, aceste rezultate fiind însă contrazise de studii ulterioare. Cilostazolul (Pletal) este tot un inhibitor al fosfodiesterazei 3. Acesta creşte plasticitatea globulelor roşii. Acest efect este benefic la pacienţii cu claudicaţie intermitentă, eritrocitele astfel influenţate fiind capabile să se deplaseze prin arterele şi venele stenozate cu mai multă uşurinţă.

Fosfodiesterazele de tip 4 sunt prezente în multe celule implicate în procesele de inflamaţie şi în imunitate. Acestea inactivează preferenţial AMPc. Inhibitorii specifici ai fosfodiesterazelor 4, studiaţi pentru tratamentul astmului şi bronhopneumopatiei cronice obstructive sunt cilomilast şi roflumilast.

Fosfodiesterazele de tip 5 sunt prezente în special la nivelul corpilor cavernoşi, unde inactivează GMPc. Inhibarea fosfodiesterazelor 5 cu sildenafil încetineşte hidroliza GMPc, care se acumulează, determinând vasodilataţie şi erecţie.

Papaverina este un vasodilatator şi un antispastic musculotrop care acţionează, cel puţin parţial, prin inhibarea fosfodiesterazelor şi creşterea concentraţiilor intracelulare de AMPc. A fost mult utilizat ca vasodilatator, fiind în prezent înlocuit de alte droguri mai selective. Este încă folosit în secţiile de chirurgie pentru evitarea spasmului vaselor ce urmează a fi grefate şi la anumiţi pacienţi pentru tratamentul disfuncţiilor erectile, existând, în acest ultim caz, un risc minor de priapism.

14.3.2 Ionul de calciu (Ca^{2+})

Ca^{2+} este un mesager ubicuitar, cu rol important în transducţia semnalului, fiind implicat în motilitatea celulară, fertilizarea ovulului, neurotransmitere şi secreţia proteică, dar şi în fuziunea, diferenţierea şi proliferarea celulară, reglarea activităţii enzimatice, a pompelor ionice şi a componentelor citoscheletului.

Ca^{2+} poate interveni în mecanismele de transducţie a semnalului graţie influxului realizat prin activarea canalelor ionice, sau ca mesager secund implicat în mecanisme de transducţie a semnalului în care intervin receptorii cuplaţi cu proteine G. Odată pătruns în citoplasmă, Ca^{2+} exercită efecte reglatoare allosterice asupra unui număr mare de enzime şi proteine.

Deplasarea ionilor de Ca^{2+} din compartimentul extracelular în compartimetul intracelular modifică fenomenul de depolarizare membranară. Un astfel de mecanism este prezent la nivelul cordului, pe parcursul fazei de platou a potenţialului de acţiune, Ca^{2+} participând la menţinerea depolarizării.

Menţinerea gradientului de concentraţie al calciului între spaţiul extracelular şi cel intracelular se face cu un important consum de energie. Astfel, concentraţia calciului intracelular în condiţii bazale este de ordinul 10^{-7} moli/L (100nM), în timp ce concentraţia calciului extracelular este în mod normal de ordinul 10^{-3} moli/L (1mM). Acest gradient important permite realizarea unor schimbări rapide ale calciului: legarea unui număr mare de receptori homonali spre exemplu, duce la creşterea rapidă (în interval de câteva secunde) a concentraţiei calciului intracelular până la valori micromolare. Semnale specifice pot declanşa creşterea bruscă a nivelurilor citoplasmatice de Ca^{2+} până la 500-1000nM, prin deschiderea canalelor de la nivelul reticulului endoplasmic sau membranei plasmatice.

Creşterea şi scăderea rapidă a concentraţiei calciului este reglată foarte strict şi se bazează pe

o serie de mecanisme ce implică compartimentarea celulară. Spre exemplu, concentraţia intracelulară de Ca^{2+} poate fi scăzută prin sechestrarea Ca^{2+} în reticulul sarcoplasmic, prin acţiunea ATP-azei de Ca^{2+}, sau în mitocondrii pe baza energiei generate de gradientul electrochimic. Pe de altă parte, Ca^{2+} liber poate fi chelat prin legarea de proteinele care leagă Ca^{2+}, precum calsechestrina.

Multe dintre evenimentele dependente de Ca^{2+} se produc atunci când Ca^{2+} eliberat se fixează şi activează proteina reglatoare calmodulina.

Ionii de Ca^{2+} sunt mesagerii secunzi cu cea mai largă utilizare:

- Activează contracţia musculară prin legarea de troponină, care duce la activarea interacţiunii actină-miozină;
- Eliberare de neurotransmiţători la nivelul sinapselor neuronale, unde joacă un rol esenţial în activarea şi deprimarea pe termen lung;
- Secreţia unor hormoni (insulină);
- Apoptoză;
- Adeziunea celulelor la matricea extracelulară;
- Activarea celulelor T şi B ale sistemului imun.

Eliberarea calciului în citosol este reglată prin:

- Canalele voltaj-dependente - după depolarizare ionii de Ca^{2+} sunt eliberaţi din depozite în reticulul sarcoplasmic al fibrelor musculare netede, al muşchilor striaţi, în receptorii gustativi pentru gustul sărat, neuroni.
- Canale ionice activate de receptori de la nivelul membranelor postsinaptice.
- Receptori cuplaţi cu proteine G, care declanşează eliberarea ionilor de Ca^{2+} din reticulul sarcoplasmic.

Revenirea calciului în spaţiul extracelular se realizează prin mecanisme de transport activ:

- Pompa de Ca^{2+}.
- Antiportul Na^+/Ca^{2+} - care utilizează energia produsă prin fluxul a trei ioni de Na^+ pe baza gradientului de concentraţie pentru a pompa un ion de Ca^{2+} împotriva gradientului de concentraţie.

Recaptarea calciului de către reticulul endoplasmic se realizează prin acţiunea pompei de Ca^{2+}.

14.3.2.1 Calmodulina

Calmodulina (CALcium MODULated proteIN) este o proteină cu greutate moleculară de 17kDa, distribuită în toate celulele plantelor şi animalelor (reprezentând aproximativ 1% din totalul proteinelor celulare). Aceasta aparţine unei familii de proteine caracterizate prin una sau mai multe elemente structurale ce fixează Ca^{2+}, numite EF hand motif. Calmodulina este alcătuită din două structuri globulare similare, unite printr-un α-helix de dimensiuni mari (6,5nm, 65Å), fiecare lob globulinic având două structuri EF, de legare a calciului, la distanţă de 1,1nm (11 Å) una faţă de cealaltă. Aceasta se poate fixa şi poate regla un număr mare de proteine distincte, fiind astfel implicată în diferite funcţii celulare. Calmodulina poate fixa până la 4 ioni de Ca^{2+}, după care poate suferi modificări posttranslaţionale precum fosforilare, acetilare, metilare sau clivaj proteolitic, fiecare dintre aceste procese modulându-i acţiunea.

Legarea a trei sau patru ioni de Ca^{2+} (fenomen care se produce atunci când nivelul intracelular de calciu creşte la circa 500nmoli/l) induce o modificare importantă a conformaţiei, care permite calmodulinei să se fixeze şi să modifice proteinele ţintă precum fosfodiesteraza AMPc-dependentă. Legarea unui număr mare de ioni de Ca^{2+} permite realizarea unei activări a calmodulinei mai intense, astfel încât mici modificări în concentraţia calciului cauzează modificări intense în concentraţia calmodulinei activate de Ca^{2+}, conducând în continuare la amplificarea semnalului hormonal iniţial.

Calmodulina mediază procese precum inflamaţia, metabolismul, apoptoza, contracţia musculară, memoria de lungă şi scurtă durată şi răspunsul imun. Aceasta este localizată într-o multitudine de tipuri celulare, putând avea diverse locaţii subcelulare (citoplasmă, organite intracelulare). Multe dintre proteinele de care se leagă calmodulina sunt incapabile de a se lega ele însele de Ca^{2+}, calmodulina acţionând astfel ca un senzor de Ca^{2+} şi ca un element de transducţie a semnalului.

Calmodulina are o serie largă de efectori ţintă, incluzând proteinkinazele Ca^{2+}/calmodulin-dependente, care fosforilează reziduurile proteice serină-treonină, reglând o gamă largă de procese. Spre exemplu, Ca^{2+}/calmodulin kinaza II, o kinază cu specificitate largă, este implicată în reglarea metabolismului energetic, permeabilităţii ionice, biologiei neurotransmiţătorilor, activităţii kinazei lanţurilor uşoare de miozină şi activităţii fosforilazkinazei. În mod interesant, calmodulina serveşte ca unitate reglatoare permanentă a fosforilazkinazei, dar poate regla totodată efectori non-kinaze, precum unele izoforme de adenilat ciclază sau fosfodiesterază AMPc-dependentă, evidenţiind interacţiunea dintre căile semnal

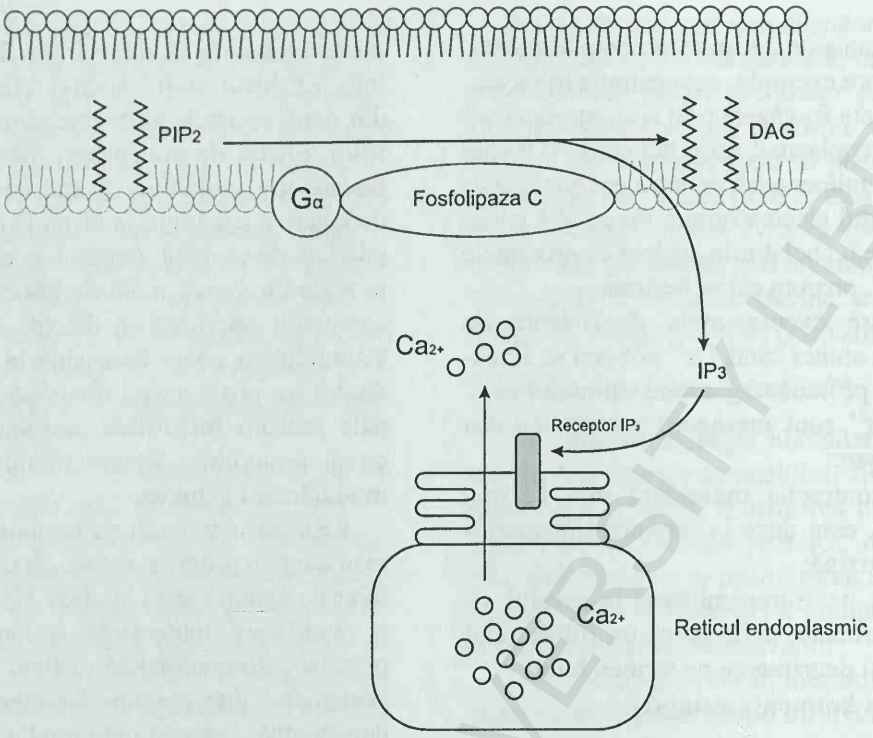


Figura 14.6. Generarea diacilglicerolului (DAG) şi a inozitol trifosfatului (I-1,4,5-P_3) ca urmare a activării fosfolipazei C

AMPc şi respectiv Ca^{2+}-dependente. Mai mult decât atât, şoarecii defectivi de adenilat ciclaza calmodulin-dependentă sunt defectivi de memorie spaţială, evidenţiind faptul că sistemul de transducţie a semnalului este important în cadrul proceselor de învăţare şi memorie la vertebrate.

14.3.3 Inozitol 1, 4, 5 trifosfatul (IP_3) şi diacilglicerolul (DAG)

14.3.3.1 Fosfatidilinozitol 4,5-difosfatul (PIP_2)

O realizare majoră în cadrul cercetărilor asupra mesagerilor secunzi responsabili de mobilizarea calciului a survenit la începutul anilor 1980, când s-a descoperit că stimularea receptorilor cunoscuţi a creşte nivelurile intracelulare de Ca^{2+} poate induce hidroliza mediată de fosfolipaza C a unei mici specii de fosfolipide, fosfatidilinozitol 4,5-difosfatul (PIP_2) (*Figura 14.6*).

PIP_2 este un component fosfolipidic minor al membranelor celulare, fiind un important substrat pentru un număr mare de proteine semnal. PIP_2, care reprezintă în general 0,4% din totalul fosfolipidelor membranare, este obţinut din fosfatidilinozitol prin intervenţia a două kinaze, fosfatidilinozitol kinaza 4 şi fosfatidilinozitol kinaza 5, ambele fiind dispuse în membrana plasmatică. PIP_2 este hidrolizată de fosfolipaza C-PIP_2-specifică, cu formarea consecutivă a doi mesageri secunzi: inozitol trifosfat (I-1, 4, 5-P_3) şi diacilglicerol (DAG). IP_3 este un compus solubil în apă, eliberat în citosol şi a cărui implicare în mobilizarea depozitelor intacelulare de Ca^{2+} a fost demonstrată. DAG este un mesager secund de natură lipidică, ancorat de membrana plasmatică graţie lanţurilor hidrofobe şi care activează o familie de enzime semnal cunoscute sub numele de proteinkinaze C.

O serie de hormoni precum acetilcolina (receptorii muscarinici), angiotensina, calcitonina, catecolaminele (receptorii α_1-adrenergici), peptidele opioide, factorul de creştere derivat plachetar, serotonina (receptorii 5-HT_2), somatostatina, thyrotropin-releasing hormone (TRH) şi vasopresina (receptorii V_2) îşi manifestă efectele prin intermediul fosfoinozitidelor. O parte dintre aceşti hormoni, neurotransmiţători sau factori de creştere se leagă de receptori cuplaţi cu proteine G, în timp ce alţii se leagă de receptorii tirozinkinazici. Indiferent care dintre cei doi receptori este activat, pasul cel mai important este stimularea unei enzime membranare, fosfolipaza C, care hidrolizează specific fosfatidilinozitol 4,5-difosfatul (PIP_2).

Clasa I de PI 3-kinaze fosforilează PIP_2 formând fosatidilinozitol 3, 4, 5 trifosfat (PIP_3).

Atât PIP_2 cât şi PIP_3, acţionează nu numai ca substrat enzimatic, ci servesc şi ca fosfolipide care se leagă de domenii specifice ce promovează recrutarea proteinelor la nivelul membranei plasmatice şi apoi activarea cascadelor de transducţie a semnalului.

Această cale de transducţie a semnalului reprezintă o ţintă pentru obţinerea unor agenţi terapeutici. Spre exemplu efectele terapeutice ale ionului de Li^+, utilizat ca agent terapeutic în sindromul maniaco-depresiv, pot fi mediate prin efectele aupra metabolismului fosfoinozitidelor.

14.3.3.2 Inozitol 1, 4, 5 trifosfatul (IP_3)

IP_3, împreună cu DAG, sunt mesageri secunzi utilizaţi în mecanismele de transducţie a semnalului.

IP_3 se leagă şi activează receptorul corespunzător de la nivelul membranei reticulului sarcoplasmic, care deschide la rândul său canalele de Ca^{2+}, ducând la eliberarea calciului în citoplasmă. Această creştere a calciului activează receptorii ryanodinici de la nivelul reticulului sarcoplasmic, ducând la creşterea în plus a concentraţiilor de Ca^{2+}.

Producţia rapidă (în mai puţin de 1 secundă) şi eliminarea rapidă ($t_{1/2}$ = 4 secunde în ficat) a IP_3, care precede creşterea concentraţiilor intracelulare de Ca^{2+} sugerează posibilitatea implicării unui mesager secund ca moleculă semnal pentru mobilizarea Ca^{2+}. Două tipuri de experimente dovedesc faptul că IP_3 este într-adevăr un mesager secund:

- Microinjectarea IP_3 în celule – sau simpla adăugare a IP_3 în timpul procesului de incubare a celulelor, la nivelul cărora tratamentul cu detergenţi a indus formarea de orificii şi pori în membrana plasmatică (celule permeabilizate), produce mobilizarea calciului în absenţa stimulării hormonale.
- Analiza structurii şi funcţiei unei varietăţi de molecule de inozitolfosfat a sugerat că mobilizarea calciului este dependentă de receptori IP_3-specifici.

Receptorii care realizează legături cu IP_3 şi eliberarea subsecventă a calciului au fost recent clonaţi. Aceşti receptori sunt exprimaţi la nivelul reticulului endoplasmic al tuturor celulelor ca o familie de glicoproteine (cu masă moleculară de 250 kDa), fiind alcătuiţi din şase domenii transmembranare. Receptorul activ este exprimat ca un multimer alcătuit din patru molecule receptoare de IP_3; această structură tetramerică determină creşterea activităţii canalelor de Ca^{2+}. Se estimează că IP_3 stimulat (în general în cantitate de 2-3 mmol/L) eliberează 20-30 de ioni de Ca^{2+}. Această constatare scoate în evidenţă amplificarea ce are loc în cadrul acestei cascade, întrucât, în general, sunt necesare doar concentraţii de nivel nanomolar ale factorilor de creştere pentru a produce concentraţii de ordin milimolar ale acestui mesager secund. În concordanţă cu natura tranzitorie a eliberării intracelulare de Ca^{2+} observată după legarea hormonului de receptor, concentraţiile intracelulare de IP_3 revin rapid la valorile de repaus (0,1 mmol/L) prin mai multe căi de degradare.

Principalele funcţii ale IP_3 sunt de a mobiliza Ca^{2+} din depozite şi de a regla proliferarea celulară. La nivelul muşchilor netezi, spre exemplu, creşterea concentraţiilor intracelulare de Ca^{2+} vor declanşa contracţia acestora.

14.3.3.3 Diacilglicerolul (DAG)

DAG îşi indeplineşte rolul de mesager secund prin activarea enzimei semnal proteinkinaza C, care fosforilează o gamă largă de proteine ţintă implicate în transducţia semnalului, la nivelul reziduurilor serină şi treonină.

DAG este rapid inactivat, fie prin fosforilare, al cărei rezultat este acidul fosfatidic, care este ulterior reconvertit în fosfolipide, fie prin deacilare, cu formarea acidului arahidonic.

14.3.3.3.1 Proteinkinaza C

Proteinkinaza C a fost identificată iniţial ca o kinază Ca^{2+}- şi lipid- (fosfatidilserină) dependentă, importantă în reglarea proliferării celulare. Cu toate acestea, pe parcursul ultimilor ani, a devenit evident faptul că proteinkinaza C este de fapt un nume generic utilizat pentru a descrie o superfamilie de kinaze înrudite, cu diverse distribuţii la nivel tisular şi cu diferite căi de activare.

Proteinkinazele C sunt reprezentate de 10 izoenzime. Acestea se împart în 3 subfamilii, pe baza mesagerului secund pe care îl utilizează: clasice, noi şi atipice. Proteinikinazele clasice cuprind izoformele α, βI, βII şi γ. Acestea necesită prezenţa calciului, DAG-ului şi a unui fosfolipid precum fosfatidilcolina pentru a fi activate. Proteinkinazele noi includ izoformele δ, ε, η şi θ şi necesită DAG, dar nu şi Ca^{2+} pentru activare. Astfel, proteinkinazele C clasice şi cele noi sunt activate prin acelaşi mecanism de transducţie a semnalului ca şi fosfolipaza C. Pe de altă parte, proteinkinazele C atipice (incluzând izoformele Mξ şi ι/λ) nu necesită nici Ca^{2+}, nici DAG pentru activare. Termenul de proteinkinaze C se referă de obicei la toate izoformele.

Toate enzimele din această familie au în comun o serie de caracteristici. În primul rând, toate sunt alcătuite din două structuri majore: situsul reglator N-terminal şi situsul C-terminal, o kinază cu activitate catalitică. În absenţa factorilor activatori (Ca^{2+}, fosfolipide, DAG), situsul reglator interacţionează cu domeniul de legare al substratului al situsului catalitic şi blochează activitatea proteinkinazei C. Legarea cofactorilor reduce afinitatea acestei interacţiuni, induce modificări conformaţionale ale proteinkinazei C şi permite activarea acesteia.

Cu toate că proteinkinaza C este în general considerată ca o kinază a serinei, aceasta poate fosforila şi treonina, dar niciodată reziduurile de tirozină. În mod interesant, proteinkiaza C poate fosforila aceleaşi proteine ţintă ca şi proteinkinaza A, dar proteinkinaza C fosforilează de obicei reziduurile serină, în timp ce proteinkinaza A fosforilează de obicei reziduurile treonină.

După activare, proteinkinazele C sunt translocate în membrana plasmatică. Acestea sunt cunoscute pentru durata lor lungă de acţiune. Ele rămân activate şi după ce activarea iniţială a trecut. Acest fapt se datorează probabil producţiei de DAG din fosfatidilcolină sub acţiunea fosfolipazelor, dar acizii graşi pot juca şi ei un rol.

Pentru proteinkinazele C au fost descrise un număr mare de funcţii. Acestea sunt implicate în desensibilizarea receptorilor, în modularea modificărilor membranei celulare, în reglarea transcripţiei, medierea răspunsurilor imune, reglarea creşterii celulare şi în procesele de învăţare şi memorie. Aceste funcţii sunt îndeplinite prin fosforilarea mediată de proteinkinaza C a unui număr mare de proteine. Întrucât substratul proteic disponibil pentru fosforilare variază, efectele proteinkinazei C sunt diferite în funcţie de tipul celular.

Proteinkinazele C intervin la nivelul tractului digestiv în contracţia sfincterelor, la nivelul sistemului vizual în contracţia muşchilor dilatatori şi constrictori ai irisului, contracţia muşchilor ciliari, la nivelul aparatului urinar în contracţia sfincterului uretral, contracţia ureterelor, a vezicii urinare, dar şi în contracţia miometrului, contracţia muşchilor erectori ai firelor de păr, vasoconstricţie, ejaculare, bronhoconstricţie, excitaţia neuronală, agregarea plachetară, stimularea secreţiei lichidului cefalorahidian, a secreţiei salivare, sudoripare şi a secreţiei gastrice acide, în gluconeogeneză şi glicogenoliză.

14.3.3.4 Fosfolipazele

Fosfolipazele reprezintă o clasă ubicuitară de enzime cu rolul de a cataliza hidroliza legăturilor esterice ale fosfogliceridelor şi glicerofosfatidelor, convertind fosfolipidele în acizi graşi şi alţi compuşi lipidici. Întrucât produşii lor sunt mesageri secunzi, acestea sunt puternic reglate de către celule.

În cadrul multor sisteme hormonale, cu toate că hidroliza PIP_2 este tranzitorie şi rapid blocată, generarea DAG este susţinută. Acest fenomen, împreună cu producerea a multiple izoforme de proteinkinază C, dintre care unele nu necesită prezenţa calciului sau DAG pentru activare, a dus la descoperirea unor receptori adiţionali lipidici ai căilor semnal, implicând fosforilarea fosfatidilcolinei şi fosfatidiletanolaminei, care pot creşte nivelurile de DAG şi de alte lipide cu activitate biologică, ca răspuns la factori de creştere sau mitogeni. Fosfatidilcolina reprezintă circa 40% din totalul fosfolipidelor celulare. Aceasta poate fi hidrolizată de o serie de fosfolipaze distincte, generând o diversitate de mesageri secunzi de natură lipidică, inclusiv acidul arahidonic (generat de fosfolipaza A_2), ca şi diferite specii de DAG (generate de fosfolipaza C) şi acidul fosfatidic (generat de fosfolipaza D). În plus, a fost raportată şi activitatea hormon-stimulată a compusului fosfatidiletanolamină-fosfalipază D.

Fosfolipaza A_1 hidrolizează grupul acil din poziţia 1, în timp ce fosfolipaza A_2 hidrolizează grupul acil din poziţia 2, pentru a forma acizi graşi şi alţi produşi fosfolipidici.

Fosfolipazele D şi A_2 susţin activarea proteinkinazei C prin hidroliza pe care acestea o mediază la nivelul fosfatidilcolinei membranare.

Unii hormoni sau factori de creştere pot stimula doar una sau celalată dintre aceste fosfolipaze, dar alţi liganzi sunt capabili de a activa toate aceste căi, după legarea de receptorul specific. De aici capacitatea de a genera multiple specii distincte de DAG şi acid fosfatidic, în concordanţă cu lanţurile corespunzătoare de acizi graşi ale PIP_2 (predominent stearat/ arahidonat), fosfatidilcolină şi fosfatidiletanolamină. Mai mult decât atât, speciile DAG rezultate pot fi metabolizate în continuare la acid arahidonic prin intermediul DAG-lipazei sau, pe altă cale, DAG poate fi convertit în acid fosfatidic prin intermediul DAG-kinazei. Invers, acidul fosfatidic poate fi convertit în DAG sub acţiunea fosfohidrolazei acidului fosfatidic.

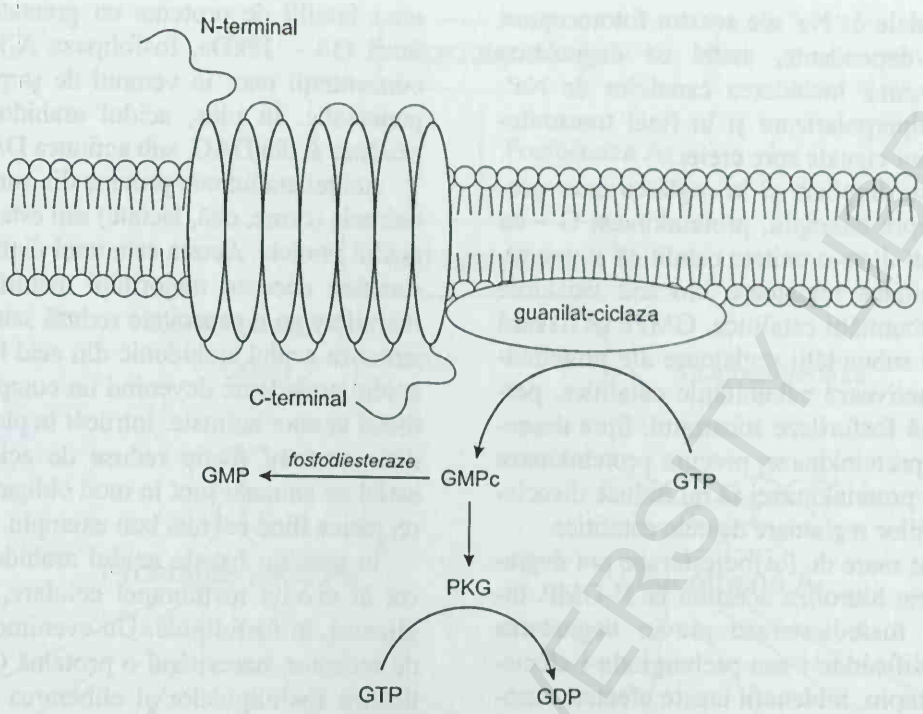


Figura 14.7. Sinteza GMPc ca urmare a activării guanilatciclazei

Se adună tot mai multe dovezi că toţi aceşti mesageri secunzi de natură lipidică acţionează pe ţinte diferite. Spre exemplu, s-a emis recent ipoteza că acizii graşi saturaţi/mononesaturaţi care conţin DAG, derivaţi din activarea fosfolipazei D fosfatidilcolin-specifică sunt incapabili de a activa izoforme de proteinkinază C şi că doar speciile de acid stearoil-arahidonil-fosfatidic pot modula activitatea GTP-azei *Ras*. Generarea acestor mesageri secunzi de natură lipidică de o mare diversitate, dar totuşi aflaţi în interrelaţie, realizează astfel un mecanism pentru activarea şi respectiv blocarea răspunsurilor hormon-specifice prin intermediul unor căi particulare de transducţie a semnalului, inclusiv prin activarea unor izoforme diferite de proteinkinază C.

14.3.4 Guanozin monofosfatul ciclic (GMPc)

GMPc este un nucleotid ciclic derivat din GTP. Acesta funcţionează ca şi mesager secund, asemănător AMPc, în special prin activarea proteinkinazelor intracelulare, ca răspuns la legarea hormonilor de natură proteică la receptorii membranari.

Sinteza GMPc este catalizată de guanilatciclază, care converteşte GTP în GMPc. Guanilatciclaza membranară este activată de hormoni peptidici, precum factorul natriuretic atrial, în timp ce guanilatciclaza solubilă este stimulată în special de NO (*Figura 14.7*).

Spre deosebire de AMPc, transportorul ubicuitar şi binecunoscut al unui număr mare de mesaje, GMPc este un mesager "specializat", cu roluri bine stabilite în transducţia semnalului la nivelul unui număr redus de tipuri celulare. La nivelul mucoasei intestinale şi muşchiului neted vascular mecanismul de transducţie a semnalului GMPc-dependent se desfăşoară în strict paralelism cu mecanismul de transducţie a semnalului AMPc-mediat. Liganzii detectaţi de receptorii de la suprafaţa celulei stimulează guanilatciclaza ataşată membranei să producă GMPc, iar GMPc, la rândul său, stimulează o proteinkinază GMPc-dependentă. Acţiunea GMPc la nivelul acestor celule este terminată prin degradarea enzimatică a nucleotidelor ciclice şi prin defosforilarea substraturilor kinazei.

Creşterea concentraţiei GMPc duce la relaxarea muşchiului neted vascular printr-un mecanism mediat de kinază, care pare să implice fosforilarea kinazei lanţurilor uşoare de miozină. La nivelul acestor celule guanilatciclaza este stimulată de către un hormon peptidic cu origine sanguină, de către factorul natriuretic atrial şi de către factorul de relaxare derivat endotelial (NO), ca răspuns la acţiunea indirectă a agenţilor vasodilatatori precum acetilcolina sau histamina.

GMPc este totodată un reglator al conductanţei canalelor ionice, glicogenolizei şi apoptozei celulare. GMPc este un mesager secund implicat şi în fototransducţie, la nivelul analizatorului vizual. În fotoreceptorii oculari, prezenţa luminii stimulează fosfodiesterazele, care degradează

GMPc. Canalele de Na^+ ale acestor fotoreceptori sunt GMPc-dependente, astfel că degradarea GMPc determină închiderea canalelor de Na^+, producând hiperpolarizare şi în final transmiterea informaţiei vizuale spre creier.

GMPc este implicat şi în reglarea unor proteinkinaze, spre exemplu, proteinkinaza G - un dimer alcătuit dintr-o unitate catalitică şi una reglatoare, unitatea reglatoare blocând situsurile active ale subunităţii catalitice. GMPc se fixează de situsurile subunităţii reglatoare ale proteinkinazei G şi activează subunităţile catalitice, permiţându-le să fosforileze substratul. Spre deosebire de alte proteinkinaze, precum proteinkinaza A, activarea proteinkinazei G nu induce disocierea subunităţilor reglatoare de cele catalitice.

Un număr mare de fosfodiesteraze pot degrada GMPc prin hidroliza acestuia la 5'-GMP. Inhibitorii de fosfodiesteraze previn degradarea GMPc, amplificându-i sau prelungindu-i efectele. Spre exemplu, Sildenafil creşte efectele vasodilatatoare ale GMPc la nivelul corpilor cavernoşi, fiind utilizat în tratamentul disfuncţiilor erectile. Acest drog poate inhiba însă şi fosfodiesteraza 6 retiniană, ducând la scăderea sensibilităţii vizuale. Acest efect poate fi în mare parte evitat prin utilizarea inhibitorului selectiv de fosfodiesterază 5 – tadalafil.

14.3.5 Acidul arahidonic

Ca şi structură chimică, acidul arahidonic este un acid carboxilic cu 20 de atomi de carbon şi 4 legături duble. Acesta este un acid gras polinesaturat, prezent în fosfolipide (mai ales în fosfatidiletanolamină, fosfatidilcolină şi fosfatidilinozitide) ale membranelor celulare, dar şi în ţesutul cerebral, în cantităţi mari.

Pe lângă implicarea sa ca mesager secund de natură lipidică necesar pentru reglarea unor enzime semnal, precum fosfolipaza C–γ, fosfolipaza C–δ şi proteinkinaza C izoformele α, β şi γ, acidul arahidonic este un mediator cheie în cadrul proceselor inflamatorii. Acidul arahidonic, implicat în procese atât de diferite, pare a fi generat pe două căi distincte legate de fosfolipaza A_2. Acidul arahidonic generat în vederea utilizării în transducţia semnalului pare a fi generat prin acţiunea fosfolipazei A_2 citosolice fosfatidilcolin-specifice, cu masă moleculară de 85kDa, a cărei activitate este reglată prin fosforilarea reziduurilor serină. Spre deosebire de acesta, acidul arahidonic implicat în procesele inflamatorii este generat prin acţiunea unei familii de proteine cu greutate moleculară mică (14 – 18kDa, fosfolipaza A_2), prezente în concentraţii mari în veninul de şarpe şi în sucul pancreatic. În plus, acidul arahidonic se poate produce şi din DAG, sub acţiunea DAG-lipazei.

Acidul arahidonic provine din surse alimentare animale (carne, ouă, lactate) sau este sintetizat din acidul linoleic. Acesta este unul dintre acizii graşi esenţiali necesari majorităţii mamiferelor. Unele mamifere au o capacitate redusă sau absentă de a sintetiza acidul arahidonic din acid linoleic, astfel acidul arahidonic devenind un compus esenţial al dietei acestor animale. Întrucât în plante se găsesc doar cantităţi foarte reduse de acid arahidonic, astfel de animale sunt în mod obligatoriu carnivore, pisica fiind cel mai bun exemplu.

În condiţii bazale acidul arahidonic este stocat la nivelul membranei celulare, esterificat la glicerol, în fosfolipide. Un eveniment dependent de receptor, necesitând o proteină G, iniţiază hidroliza fosfolipidelor şi eliberarea acizilor graşi în mediul intracelular. Reacţia de deacilare poate fi mediată de trei enzime: fosfolipaza A_2, fosfolipaza C şi fosfolipaza D. Fosfolipaza A_2 catalizează hidroliza fosfolipidelor în poziţia 2. Astfel, această enzimă poate elibera arahidonatul printr-o reacţie într-un singur pas (*Figura 14.8*). Pe de altă parte, fosfolipazele C şi D nu eliberează acidul arahidonic în mod direct. Acestea generează produşi lipidici ce conţin arahidonat (DAG şi respectiv acid fosfatidic), care pot fi eliberaţi ulterior sub acţiunea DAG- şi monoacilglicerol-lipazelor. Odată eliberat, arahidonatul poate urma trei căi: reîncorporarea în fosfolipide, difuziunea în spaţiul extracelular sau metabolizarea.

Acidul arahidonic este un precursor al eicosanoidelor:

- Enzimele ciclooxigenază şi peroxidază duc la formarea prostaglandinei H_2, care la rândul ei este utilizată pentru sinteza prostaglandinelor, prostaciclinei şi tromboxanilor.
- Enzima 5-lipooxigenază duce la formarea acidului 5-hidroperoxieicosatetraenoic, utilizat la rândul său pentru sinteza de leucotriene.
- Acidul arahidonic este utilizat şi pentru sinteza de anandamide.
- O parte din acidul arahidonic este convertit în acizi hidroxieicosatetraenoici şi epoxieicosatrienoici, sub acţiunea epoxigenazei.

Producerea acestor derivaţi şi acţiunea lor la nivelul organismului sunt cunoscute sub numele

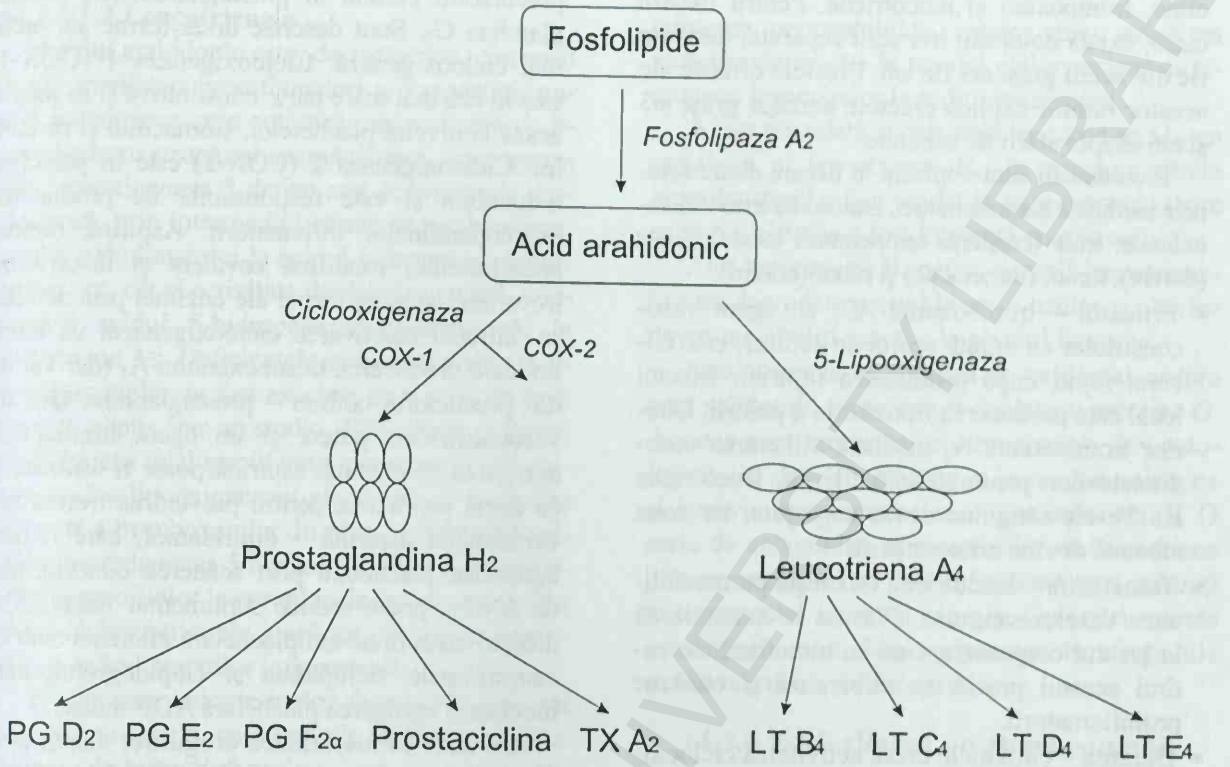


Figura 14.8. Etapele formării prostaglandinelor şi leucotrienelor din acidul arahidonic eliberat din fosfolipidele membranare de fosfolipaza A_2

de cascada acidului arahidonic. O serie de produşi rezultaţi prin aceste căi modulează activităţile canalelor ionice, proteinkinazelor, pompelor ionice. Eicosanoizii nou formaţi pot părăsi celula şi pot acţiona la distanţă, prin legarea de receptorii cuplaţi cu proteine G. În final, acţiunea eicosanoizilor se poate termina prin difuziune, captarea în fosfolipide sau degradare enzimatică.

Cercetările bazate pe alimentaţia şoarecilor cu acid arahidonic sugerează implicarea acestuia în boala Alzheimer.

14.3.5.1 Eicosanoizii

Eicosanoizii sunt molecule eliberate de majoritatea celulelor, care acţionează asupra aceleiaşi celule sau asupra celulelor învecinate (sunt mediatori autocrini sau paracrini) şi care sunt rapid inactivaţi. Eicosanoizii nu sunt stocaţi la nivelul celulelor, ci sunt sintetizaţi în funcţie de necesităţile organismului. Aceştia iau naştere din acizii graşi aflaţi în compoziţia membranelor celulare şi nucleare. Durata de viaţă a eicosanoizilor variază de la câteva secunde la câteva minute.

Ca mediator cheie al inflamaţiei, acidul arahidonic este precursorul major al grupului de molecule numite eicosanoizi. Eicosanoizii se comportă ca hormoni, transmiţând semnalul prin intermediul receptorilor cuplaţi cu proteine G. Aceştia realizează o gamă largă de efecte biologice, incluzând modularea activităţii muşchilor netezi (tonusul vascular), agregarea plachetară, secreţia acidă gastrică, echilibrul hidrosodat, ca şi medierea durerii şi răspunsurilor inflamatorii. Mai mult decât atât, şoarecii defectivi de producerea prostaglandinelor sacrificaţi au evidenţiat faptul că prostaglandinele au roluri mai extinse decât se credea iniţial, fiind implicate în controlul unor procese complexe precum sarcina, extinderea tumorilor sau metastazarea cancerului de colon.

Eicosanoizii realizează un control complex asupra multor sisteme ale organismului, fiind implicaţi în special în inflamaţie şi imunitate, dar şi ca mesageri la nivelul sistemului nervos central. Sistemele de control dependente de eicosanoizi sunt printre cele mai complexe din organism. Eicosanoizii derivă fie din acizi graşi esenţiali ω3 fie ω6. Eicosanoizii ω6 sunt în general proinflamatori, iar cei ω3 într-o măsură mult mai mică. Cantitatea şi echilibrul acestor acizi în dieta unei persoane va afecta funcţiile organismului controlate de eicosanoizi, cu efecte asupra bolilor cardiovasculare, nivelurilor de trigliceride, tensiunii arteriale sau artritei. Sunt descrise patru familii de eicosanoizi: prostaglandine, prostaci-

cline, tromboxani şi leucotriene. Pentru fiecare clasă, există două sau trei serii separate, derivate fie din acizii graşi ω3 fie ω6. Efectele diferite ale acestor familii explică efectele acizilor graşi ω3 şi ω6 asupra stării de sănătate.

Eicosanoizii sunt implicaţi în fiecare dintre semnele cardinale ale inflamaţiei, cunoscute încă din antichitate: calor (creşterea temperaturii locale), dolor (durere), tumor (tumefacţie) şi rubor (eritem):

- Eritemul – tromboxanul A2, un agent vasoconstrictor cu durată scurtă de acţiune, este eliberat rapid după producerea injuriei. Efectul local este producerea tranzitorie a palorii. Ulterior tromboxanul A_2 mediază eliberarea vasodilatatorilor prostaglandina E_2 şi leucotriena B_4. Vasele sanguine devin angorjate, iar zona afectată devine eritematoasă.
- Tumefacţia – leucotriena B_4 creşte permeabilitatea vaselor sanguine. Plasma se acumulează în ţesutul conjunctiv, care se tumefiază. În cadrul acestui proces se eliberează şi citokine proinflamatorii.
- Durerea – citokinele cresc activitatea ciclooxigenazei 2. Aceasta duce la creşterea nivelurilor de prostaglandină E_2, care sensibilizează neuronii algici.
- Creşterea temperaturii locale – prostaglandina E_2 este totodată un puternic agent piretogen.

14.3.5.1.1 Prostaglandinele

Prima etapă în conversia acidului arahidonic în prostaglandine implică componenta ciclooxigenază a prostaglandinsintazei, care determină formarea inelului ciclopentan şi introducerea a patru atomi de oxigen, cu formarea metabolitul intemediar prostaglandina G_2. Prostaglandina G_2 este apoi supusă unei reacţii sub acţiunea hidroperoxidazei, care catalizează reducerea a doi electroni ai grupului 15-hidroperoxi la grupul 15-hidroxil cu generarea metabolitului extrem de instabil prostaglandina H_2, care poate fi convertit ulterior în alte prostaglandine, prostacicline şi tromboxani.

Prostaglandinele orchestrează o gamă largă de răspunsuri fiziologice: stimulează inflamaţia, reglează fluxul sanguin spre organe precum rinichii, controlează trnsportul ionilor prin membrane, modulează transmiterea sinaptică şi induc somnul.

Antiinflamatoarele nesteroidiene (AINS) precum aspirina sau ibuprofenul reduc inflamaţia, durerea şi produc defervescenţă prin inhibarea sintezei prostaglandinelor la nivelul primei etape, în cadrul căreia acidul arahidonic este convertit în precursorul comun al prostaglandinelor, prostaglandina G_2. Sunt descrise două forme ale enzimei ciclooxigenază. Ciclooxigenaza 1 (COX-1) este în cea mai mare parte constitutivă şi se localizează la nivelul plachetelor, stomacului şi rinichilor. Ciclooxigenaza 2 (COX-2) este în principal inductibilă şi este responsabilă de producerea prostaglandinelor inflamatorii. Aspirina (acidul acetilsalicilic) modifică covalent şi inactivează ireversibil ambele forme ale enzimei prin acetilare. Întrucât inactivarea ciclooxigenazei va bloca totodată producerea tromboxanului A_2 (derivat tot din precursorul comun – prostaglandina G_2), un vasoconstrictor potent şi un agent implicat în agregarea plachetară, aspirina poate fi utilizată şi ca agent profilactic pentru prevenirea trombozei. Combinaţia aspirină – dipiridamol, care reduce agregarea plachetară prin scăderea concentraţiei de AMPc, poate reduce suplimentar riscul. Alte droguri cu acţiune antiplachetară eficientă sunt tienopiridinele, ticlopidina şi clopidogrelul, care blochează agregarea plachetară ADP-indusă.

Cu toate că majoritatea drogurilor disponibile blochează preferenţial COX-1, sunt în studiu o serie de agenţi COX-2-selectivi, întrucât se crede că COX-2, fiind produs în condiţiile inflamaţiei, ar putea juca un rol mai important decât COX-1 în răspunsul inflamator. Mai mult decât atât, efectele adverse majore ale blocării COX-1 sunt sângerarea şi inflamaţia mucoasei gastrice, iar utilizarea inhibitorilor COX-2-selectivi ar putea ţinti în mod specific procesul inflamator şi astfel ar putea evita cele mai multe sechele asociate utilizării inhibitorilor COX-1.

Inhibitorii COX-2-selectivi, precum celecoxibul, sunt eficienţi în tratamentul afecţiunilor inflamatorii (precum artrita reumatoidă), eficienţa şi tolerabilitatea acestora fiind comparată cu cea a antiinflamatoarelor nesteroidiene clasice. Hormonii corticosteroizi precum cortizolul sunt desemenea agenţi antiinflamatori, având ca ţintă sinteza proteinelor. În cazul acestora însă, ţinta nu este ciclooxigenaza, ci mai degrabă blochează activitatea fosfolipazei A_2, care participă la producerea metabolitului intermediar cheie, acidul arahidonic. Astfel, aceste droguri sunt utile în tratamentul afecţiunilor inflamatorii în care sunt implicate leucocitele, sau în tratamentul astmului, întrucât blocarea producţiei de acid arahidonic, pe lângă blocarea sintezei de prostaglandine, va bloca şi sinteza de leucotriene.

14.3.5.1.2 Leucotrienele

Acidul arahidonic este, de asemenea, convertit în alţi mediatori proinflamatori şi vasoactivi, numiţi leucotriene, prin acţiunea unei varietăţi de lipooxigenaze structural asemănătoare. Spre exemplu, lipooxigenaza 5 deţine atât activitate de dioxigenază, prin intermediul căreia se produce conversia arahidonatului la acid 5-hidroperoxieicosatetraenoic, cât şi activitate de dehidrogenază, convertind acidul 5-hidroperoxieicosatetraenoic în leucotriena A_4. Deficienţele constituţionale ale lipooxigenazelor au fost asociate cu o serie de boli. Spre exemplu, într-un studiu, 40% dintre pacienţii cu disfuncţii mieloproliferative prezentau activitate redusă a lipooxigenazei plachetare şi producţie crescută a tromboxanilor. În plus, şoarecii defectivi de lipooxigenaza 5 dezvoltă defecte ale răspunsului neutrofilelor la complexele imune, susţinând ideea că leucotrienele joacă un rol foarte important în cadrul reacţiilor inflamatorii.

Producerea leucotrienelor face parte dintr-un proces mai amplu, care include în general şi producerea de histamină.

Calea lipooxigenazei este activă în leucocite, incluzând mastocitele, eozinofilele, neutrofilele, monocitele şi bazofilele. Când aceste celule sunt activate, acidul arahidonic este eliberat din fosfolipidele membranei celulare de către fosfolipaza A_2 şi supus ulterior acţiunii 5-lipooxigenazei. 5-lipooxigenaza converteşte acidul arahidonic în acid 5-hidroperoxieicosatetraenoic, care este redus spontan la acid 5-hidroxieicosatetraenoic.

Tipurile de leucotriene includ leucotrienele A_4, B_4, C_4, D_4, E_4 şi F_4.

Enzima 5-lipooxigenază converteşte apoi acidul 5-hidroxieicosatetraenoic în leucotriena A_4, un epoxid instabil.

În celulele dotate cu leucotriena A_4-hidrolază, precum neutrofilele sau monocitele, leucotriena A_4 este convertită într-un acid dihidroxi - leucotriena B_4, un puternic chemoatractant pentru neutrofile.

În celulele care exprimă leucotriena C_4-sintază, precum mastocitele sau eozinofilele, leucotriena A_4 este conjugată cu tripeptidul glutation pentru a forma prima cistenil-leucotrienă, leucotriena C_4. În spaţiul extracelular, leucotriena C_4 poate fi convertită succesiv în leucotrienele D_4 şi E_4. Leucotrienele C_4, D_4 şi E_4 sunt frecvent numite cistenil-leucotriene, datorită prezenţei acestui aminoacid în structura lor. Cistenil-leucotrienele acţionează asupra receptorilor de suprafaţă producând contracţia muşchilor netezi bronşici şi vasculari, creşterea permeabilităţii vaselor mici, creşterea secreţiei de mucus la nivelul căilor aeriene şi recrutarea leucocitelor la sediul inflamaţiei.

A fost postulată şi existenţa leucotrienei G_4, un metabolit al leucotrienei E_4, în structura căreia grupul cistenil a fost oxidat la un α-cetoacid (spre exemplu cisteina a fost înlocuită cu piruvat).

Atât leucotriena B_4 cât şi cistenil-leucotrienele sunt degradate parţial la nivel tisular şi ulterior devin metaboliţi inactivi la nivelul ficatului.

Leucotrienele acţionează în principal asupra unei subfamilii de receptori cuplaţi cu proteine G. Acestea sunt implicate în mecanismele fiziopatologice ale astmului bronşic şi în reacţiile alergice şi intervin în susţinerea reacţiilor inflamatorii. O serie de antagonişti ai receptorilor de leucotriene precum montelukast sau zafirlukast sunt utilizaţi în tratamentul astmului bronşic. Cercetări recente evidenţiază rolul 5-lipooxigenazei în afecţiunile cardiovasculare şi neuropsihice.

14.3.6 Fosforilarea - o etapă comună

Aproape toate căile de transducţie a semnalului care au la bază mesagerii secunzi se bazează pe fosforilarea reversibilă. Acest proces joacă un rol important în fiecare etapă a mecanismului de transducţie a semnalului, de la reglarea receptorilor (autofosforilarea tirozinkinazelor şi desensibilizarea receptorilor cuplaţi cu proteine G) până la reglarea kinazelor de către mesagerii secunzi şi în final a substraturilor acestor kinaze, care pot fi ele însele kinaze.

Aceste modificări asigură două funcţii principale în cadrul mecanismului de transducţie a semnalului şi anume amplificarea şi reglarea flexibilă.

În ceea ce priveşte amplificarea, legarea unui grup fosfat de reziduurile serină, treonină sau tirozină amplifică semnalul iniţial prin asigurarea unei memorii moleculare legate de activarea acestui mecanism. Defosforilarea şterge această memorie, fiind un proces care necesită însă o perioadă mai lungă de timp decât cea necesară pentru disocierea legăturii allosterice.

În ceea ce priveşte reglarea flexibilă, specificitatea diferită asupra substratului multiplelor proteinkinaze reglate de mesagerii secunzi oferă situsuri ţintă care pot fi reglate în mod independent. Astfel, AMPc, Ca^{2+} sau alţi mesageri secunzi pot profita de prezenţa sau absenţa unor anumite kinaze sau substraturi ale unor kinaze, producând efecte diferite în tipuri diferite de celule.

14.3.7 Interrelaţia dintre unele mecanisme de transducţie a semnalului bazate pe mesageri secunzi

Căile de transducţie a semnalului prin intermediul fosfoinozitidelor şi respectiv AMPc funcţionează în opoziţie una cu cealaltă la nivelul unor celule şi complementar la nivelul altor celule.

Spre exemplu, agenţii vasoconstrictori ce produc contracţia muşchiului neted acţionează prin eliberarea de calciu IP_3-mediată, în timp ce agenţii care induc relaxarea muşchiului neted acţionează frecvent prin creşterea nivelurilor de AMPc.

Pe de altă parte, mesagerii secunzi AMPc şi fosfoinozitidele au acţiuni complementare în ceea ce priveşte eliberarea glucozei din ficat.

14.4 Concluzii

- Spre deosebire de sistemele de reacţii chimice ale naturii lipsite de viaţă, sistemele de reacţii biochimice precum căile metabolice, mecanismele de transducţie a semnalului sau căile de reglare genetică sunt substratul evoluţiei. Astfel, structura lor nu este arbitrară, ci sunt organizate în reţele care permit îndeplinirea funcţiilor specifice ale celulelor vii într-un mod optim.
- Celulele răspund în mod specific la o serie largă de semnale provenite din mediul extern prin intermediul sistemelor de transducţie a semnalului. Aceste sisteme sunt alcătuite din receptori celulari specifici, sisteme efectorii (adenilat ciclaza, fosfolipazele sau canalele ionice) şi proteine reglatorii (proteinele G sau tirozinkinazele).
- Aceste sisteme de transducţie a semnalului servesc la detectarea, amplificarea şi integrarea diverselor semnale provenite din mediul extern pentru a genera răspunsurile celulare corespunzătoare.
- Receptorii celulari recepţionează şi realizează transducţia semnalului hormonal specific prin cuplarea transmembranară cu diverse sisteme efectorii, în vederea generării de mesageri secunzi precum AMPc, IP_3, DAG sau Ca^{2+}, care, la rândul lor, mediază transmiterea semnalului prin activarea proteinkinazelor cheie.
- Specificitatea răspunsului la acţiunea unui hormon poate fi intensificată în continuare prin intermediul unei varietăţi de fosfolipaze (fosfolipaza C, fosfolipaza D, fosfolipaza A_2). Ţinând cont de diversitatea de potenţiale substraturi lipidice (PIP_2, fosfatidilcolină, fosfatidiletanolamină) şi totodată de diversitatea de produşi (DAG, acid fosfatidic, acid arahidonic), fosfolipazele pot genera o gamă largă de mesageri secunzi de natură lipidică, influenţând astfel în mod diferit activitatea proteinkinazelor cheie.

Bibliografie selectivă

1. Andreas-Holger M.: Medical History, ed. John. Newport Langley, 2004, 48:153–174
2. Ashcroft, F. M.: Ion Channels and Disease, Ed. Academic Press: San Diego, CA, 2000
3. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW et al: International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol. Rev., 1998, 50: 291-313
4. Bauman AL., Scott JD.: Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. Nature Cell Biol, 2002, 4:E203-206
5. Baynes JW., Marek HD.: Medical Biochemistry 2nd Edition. Elsevier Mosby, 2005, 555
6. Bertil H.: Ion channels of excitable membranes (3rd edition), ed. Sunderland, Mass : Sinauer Associates, 2001
7. Bormann J, Faigenspan A.: GABAC receptors. Trends Neurosci, 1995, 18: 515-519
8. Cairoli P., Pieraccini S., Sironi M. et al: Studies on umani taste. Synthesis of new guanosine 5'-phosphate derivatives and their synergistic effect with monosodium glutamate. J Agric Food Chem, 2008, 56 (3): 1043-1050
9. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, et al: High-resolution crystal structure of an engineered human β2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science, 2007, 318 (5854): 1258–1265
10. Chin K., Yang W., Ravatn R.: Reinventing the Wheel of cyclic AMP: Novel Mechanisms of cAMP Signaling. Ann New York Acad Sci, 2002, 968:49-64
11. Colquhoun D, Sivilotti LG.: Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. Trends Neurosci, 2004, 27: 6337-6344
12. Corringer PJ, Le Noverè N, Changeux JP.: Nicotinic Receptors at the Aminoacid Level. Annual Revues of Pharmacology and Toxicology, 2000, 40: 431-458
13. Daugan A., Grondin P., Ruault C. et al: The discovery of tadalafil: a novel and highly se-

lectiv PDE5 inhibitor. J Med Chem, 2003, 46 (21): 4533-4542
14. de Caterina R., Basta G.: n-3 Fatty acids and the inflammatory response – biological background. European Heart Journal Supplements 3, 2001, Suppl D: D42-D49
15. Eigler N., Sacca L., Sherwin RS.: Synergistic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog. J Clin Invest, 1979, 63: 114
16. Ferris CD., Snyder SH.: IP3 receptors. Ligand-activated calcium channels in multiple forms. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res., 1992, 26: 95-107
17. Fertel R., Weiss B.: Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung. Mol. Pharmacol., 1976, 12:678-687
18. Finia G.M., Sassone-Corsi P.: Cyclic AMP signalling, Journal of Cell Science, 2001, 114: 1971-1972
19. Fitzpatrick D., Purves D., Augustine G.: Table 20:2. Neuroscience (3rd ed.). Sunderland, Mass: Sinauer, 2004
20. Francis SH., Corbin JD.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. Crit Rev Clin Lab Sci, 1999, 36 (4): 275-328
21. Funk Colin D.: Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. Science, 2001, 294(5548): 1871-1875
22. Galzi JL, Changeux JP.: Neurotransmitter-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. Curr Op Struct Biol, 1994, 4: 554-565
23. Hevers W, Lüddens H.: The diversity of GABAA receptors. Mol Neurobiol, 1998, 18: 35-86
24. http://www.britannica.com/EBchecked/topic/531531/second-messenger
25. Iffland A. et al: Structural determinants for inhibitor specificity and selectivity in PDE2A using the wheat germ in vitro translation system. Biochemistry, 2005, 44 (23):8312-8325
26. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature (London), 2001, 409: 860
27. Johnson DA., Akamine P., Radzio-Andzelm E.: Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. Chem Rev, 2001, 101:2243-2270
28. Jones AK, Sattelle DB.: Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, Caenorhabditis elegans. Bioessays, 2004, 26: 39-49
29. Katzung B.G.: Basic and Clinical Pharmacology (4th Edition), A Lange Medical Book, 1989, 14-22
30. Kenakin T., Pharmacological Analysis of Drug Receptor Interactions, Raven Press, New York, 1993
31. Le Noverè N, Changeux JP.: Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor subunit family: an example of multigene family in excitable cells. J Mol Evol, 1995, 40: 155-172
32. MacDonald M., Rogers Q., Morris J.: Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore. Annu Rev Nutr, 1984, 4:521-562
33. Neves S.R., Ram P.T., Iyengar R.: G Protein Pathways, Science, 2002, 296(5573): 1636-1639
34. Ortells MO, Lunt GG.: Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. Trends neurosci, 1995, 18: 121-126
35. Parker K., Bruton L., Sanford G.L. et al: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapuetics (11th ed.). New York: McGraw-Hill, 2006, 185
36. Rang HP.: Pharmacology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003, 172-187
37. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, et al: Crystal structure of the human β2-adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature, 2007, 450 (7168): 383–387
38. Raven P.H., Johnson G.B., Losos J.B. et al: Biology (7th edition), Chapter 7, McGraw-Hill Co. NY, 2005.
39. Rivers J., Sinclair A., Crawford M.: Inability of the cat to desaturate essential fatty acids. Nature, 1975, 258 (5531):171-173
40. Robinson-White A., Stratakis CA.: Protein Kinase A Signaling: "Cross-Talk" with Other Pathways in Endocrine Cells. Ann New York Acad Sci, 2002, 968:256-270
41. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, et al: GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β2-adrenergic receptor function. Science, 2007, 318 (5854): 1266–1273
42. Rubenstein, Lester A. and Lanzara RG.: Activation of G protein-coupled receptors entails cysteine modulation of agonist binding. Journal of Molecular Structure (Theochem), 1998, 430: 57–71

43. Shabb JB.: Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. Chem Rev, 2001, 101:2381-2411
44. Shami P.J., Moore J.O., Cockerman J.P., et al: Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukaemia cells. Leukaemia Research, 1995, 19(8): 527-534
45. Soberman RJ., Christmas P.: The organization and consequences of eicosanoid signaling. J Clin Invest, 2003, 111:1107-1113
46. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. Nature. 1994, 372 (6503): 231-236
47. Stephani A., Nuno JC., Heinrich R.: Optimal stoichiometric designs of ATP-producing systems as determind by an evolutionary algoritm, J Theor Biol,1999, 199:45-61
48. Stevens FC.: Calmodulin: an introduction. Can. J. Biochem. Cell Biol., 1983, 61 (8):906-910
49. Stockman A., Sharpe LT., Tufail A. et al: The effect of sildenafil citrate (Viagra) on visual sensitivity, 2007, J Vis, 7 (8): 4
50. Strachan T., Read AP.: Leptospira. In: Human Molecular Genetics (2nd ed.) Wiley-Liss, 1999
51. Strada SJ., Uzunov P., Weiss B.: Ontogenetic development of a phosphodiesterase activator and the multiple forms of cyclic AMP phosphodiesterase of rat brain. J. Neurochem., 1974, 23:1097-1103
52. Stryer, Lubert. Biochemistry (4th Edition). Ed. W.H. Freeman and Company, 1995, 732
53. Surks H.K.: cGMP-Dependent Protein Kinase I and Smooth Muscle Relaxation: A Tale of Two Isoforms. Circ. Res. 2007, 101: 1078-1080
54. Tan CM., Brady AE., Nickols HH., et al: Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2004 44: 559–609
55. Uzunov P., Weiss B.: Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 284:220-226
56. Walter F.: Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach. Elsevier/Saunders, 2005, 108
57. Weiss B., Hait WN.: Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors as potential therapeutic agents. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1977, 17:441-477
58. Weiss B.: Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Adv. Cycl. Nucl. Res., 1975, 5:195-21

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 15. Hormonii hipofizari şi tiroidieni

Elena Luminița Enache

15.1 Hormonii hipofizari

Axa hipotalamo-hipofizară joacă un rol central în reglarea unui mare număr de sisteme hormonale şi în multe aspecte ale homeostaziei (*Figura 15.1*).

Glanda hipofiză (glanda pituitară) este situată în şaua turcească de la baza creierului, sub hipotalamus, de care este conectată prin intermediul tijei hipofizare. Din punct de vedere anatomic şi funcțional, glanda hipofiză este compusă din doi lobi distincți: unul anterior (hipofiza anterioară, denumită şi adenohipofiză) şi unul posterior (hipofiza posterioară, neurohipofiza).

Aproape toate procesele secretorii din hipofiză sunt controlate de către hipotalamus fie prin semnale umorale, fie prin semnale nervoase.

Hipofiza anterioară conține o varietate de celule diferențiate în scopul secreției a şase hormoni majori care controlează funcționarea glandelor corticosuprarenale (prin hormonul adrenocorticotrop), glandei tiroide (prin hormonul tireotrop), glandelor mamare (prin prolactină), gonadelor (prin hormonii foliculostimulant şi luteinizant) şi stimulează creşterea organismului (prin hormonul de creştere).

Secreția hipofizei anterioare este controlată prin factori de eliberare sau de inhibiție secretați la nivelul hipotalamusului şi conduşi către hipofiză printr-un sistem vascular denumit „sistemul port hipotalamo-hipofizar".

Reglarea secreției majorității hormonilor hipofizei anterioare se face prin intermediul unor semnale stimulatorii din hipotalamus. Prolactina reprezintă excepția de la această regulă, secreția sa fiind reglată prin stimuli inhibitori. Dacă tija hipofizară este lezată, atunci secreția tuturor hormonilor produşi de hipofiza anterioară scade, pe când nivelul prolactinei creşte.

Hormonii hipofizei posterioare sunt sintetizați în corpii neuronilor hipotalamici şi transportați de-a lungul axonilor acestora, prin tractul neurohipofizar al tijei pituitare. Aceşti hormoni (vasopresina şi oxitocina), sunt stocați în hipofiza posterioară şi eliberați sub controlul unor stimuli nervoşi proveniți din hipotalamus.

Interacțiunea dintre hipotalamus şi hipofiză este una de feedback. Hipotalamusul primeşte informații din toate zonele sistemului nervos central şi le utilizează pentru a controla activitatea hipofizei. Ca răspuns, glanda hipofiză eliberează hormoni care stimulează diverse glande endocrine din organism. Modificări în torentul circulator ale concentrațiilor hormonilor produşi de aceste glande, sunt detectate de către hipotalamus, care apoi creşte sau diminuează stimularea hipofizei, pentru a menține homeostazia.

15.1.1 Hormonul de creştere

15.1.1.1 Sinteza şi secreția hormonului de creştere

Hormonul de creştere (GH) este cel mai abundent hormon din hipofiză. Este un compus polipeptidic monocatenar, cu două izoforme, de 22 kDa şi, respectiv, de 20 kDa, rezultate printr-un proces de *splicing* alternativ al produsului primar de transcripție. Forma de 22 kDa are 191 resturi de aminoacizi şi două legături disulfidice

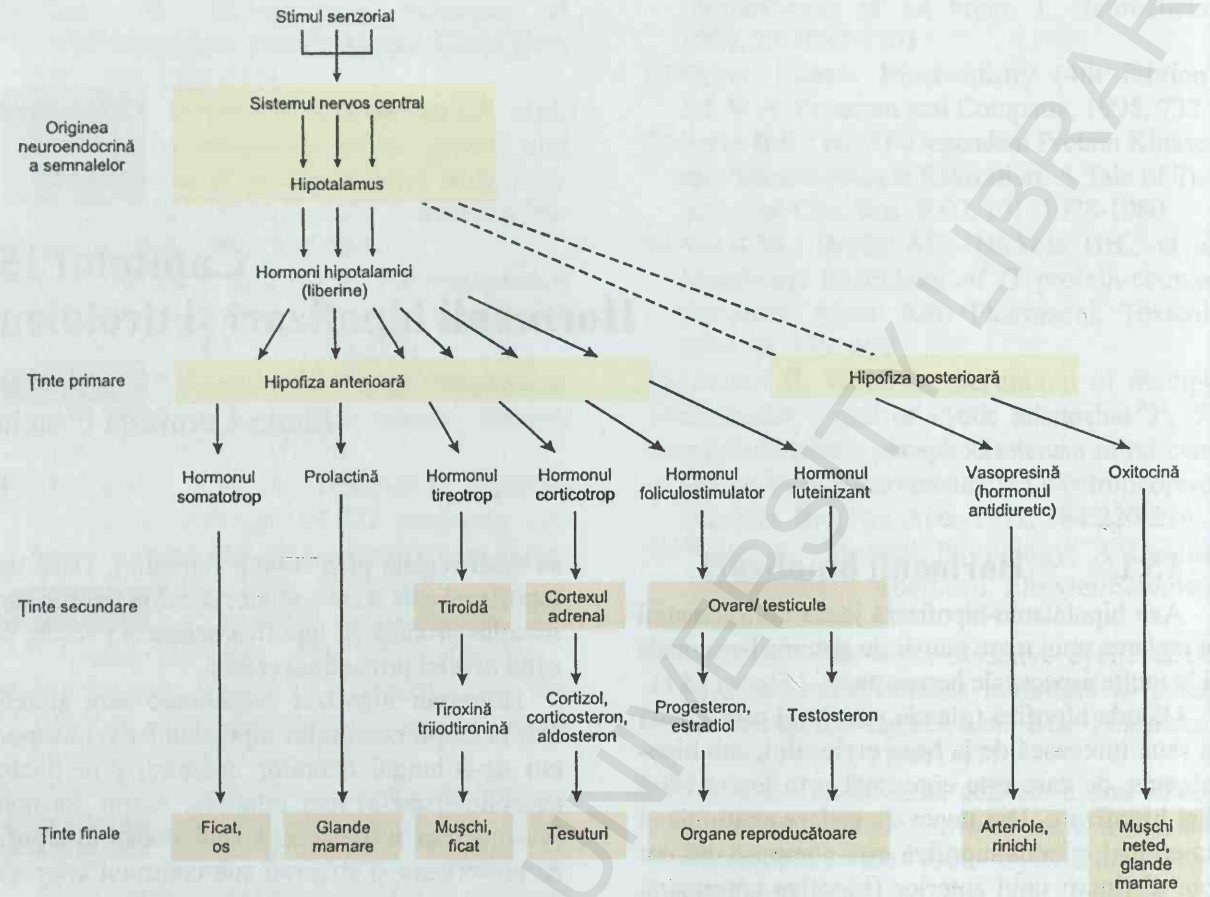


Figura 15.1. Hormonii hipofizari şi principalele ţinte ale acestora

intramoleculare. Această formă matură reprezintă ~75% din cantitatea totală de GH circulant.

GH este sintetizat ca prohormon, cu o porţiune semnal şi un capăt amino-terminal care este îndepărtat în timpul secreţiei din celulă. GH este stocat în granule secretorii la nivelul celulelor somatotrope până când un semnal secretor care creşte Ca^{2+} sau cAMP intracelular stimulează secreţia hormonului.

GH circulă în plasmă atât în formă liberă, cât şi legat de proteine (*GH-binding proteins*, GHBP) de diverse dimensiuni, care sunt, de fapt, porţiuni ale domeniului extracelular al receptorului pentru GH (GH-R). Până la 60% din GH plasmatic este legat de GHBP, fracţiunea legată scăzând la concentraţii plasmatice crescute ale GH. GHBP are rolul de a prelungi durata de viaţă a hormonului prin diminuarea clearance-ului şi vitezei sale de degradare. Timpul de înjumătăţire al GH la om este de ~25 min.

În afara hipofizei, numeroase alte tipuri celulare exprimă GH, dar la nivele mult mai reduse. Acestea includ celule ale sistemului nervos central, glanda mamară, gonadele, celule ale sistemelor imun şi hematopoietic. În unele dintre aceste celule, sinteza GH este reglată de către somatoliberină (GHRH), în altele nu, sugerând faptul că GH posedă şi funcţii autocrine/ paracrine în afara celor endocrine.

15.1.1.2 Efectele GH

Spre deosebire de ceilalţi hormoni hipofizari, GH nu îşi exercită funcţiile prin intermediul unei glande-ţintă, ci acţionează direct la nivelul ţesuturilor din organism, prin intermediul receptorilor specifici pentru GH (GH-R).

GH-R este exprimat în multe ţesuturi din organism, inclusiv la nivelul tractului gastrointestinal, sistemului reproducător, musculo-scheletic, cardiorespirator, excretor, hematopoetic, endocrin, imunitar, sistemului nervos central şi la nivelul tegumentului. Expresia cea mai mare a receptorului pentru GH se găseşte la nivelul ficatului. Receptorul pentru GH aparţine familiei de receptori pentru citokine. Este localizat membranar, având un domeniu extracelular, un singur

helix transmembranar şi un domeniu intracelular. O moleculă de GH se leagă asimetric de domeniile extracelulare a două molecule de receptor, producând dimerizarea receptorului. Acest fenomen declanşează interacţiunea GH-R cu kinaza Janus (Jak2) şi fosforilarea la nivelul tirozinei atât a Jak2, cât şi a GH-R, urmată de fosforilarea unor factori citoplasmatici de transcripţie, denumiţi traducători de semnal şi activatori ai transcripţiei (*signal transducers and activators of transcription*, STATs). După fosforilare, moleculele STAT dimerizează şi migrează în nucleu, unde activează transcripţia genică.

GH induce creşterea aproape a tuturor ţesuturilor din organism capabile de creştere, prin mărirea atât a volumului celular, cât şi a numărului de celule. GH promovează, de asemenea, diferenţierea unor anumite tipuri de celule, precum cele implicate în creşterea osoasă şi celulele musculare timpurii.

Efectul fenotipic dominant al GH este promovarea creşterii în lungime a oaselor în perioadele postnatală şi prepubertară de dezvoltare a organismului, consecutiv, pe de o parte, stimulării proliferării condrocitelor şi osteoblaştilor şi, pe de altă parte, efectelor asupra celulelor diferenţiate.

GH are, de asemenea, multiple efecte asupra anabolismului şi a metabolismului energetic al organismului. GH stimulează depozitarea de proteine în ţesuturi, prin câteva mecanisme complementare: creşterea transcripţiei ADN pentru a forma ARN; accelerarea transportului aminoacizilor prin membrana celulară, într-o manieră asemănăroare efectului insulinei asupra transportului membranar al glucozei; stimularea translaţiei ARN şi a sintezei proteinelor la nivel ribozomal; diminuarea catabolismului aminoacizilor şi a proteinelor. Sub influenţa GH, intensificarea sintezei proteice poate surveni în decurs de numai câteva minute.

GH promovează utilizarea lipidelor ca sursă de energie, în defavoarea glucidelor. Acesta intensifică eliberarea acizilor graşi din ţesutul adipos, cu creşterea consecutivă a nivelelor acizilor graşi liberi circulanţi, iar la nivel tisular, stimulează conversia acizilor graşi la acetil coenzima A. În concentraţii anormal crescute, GH poate avea efect cetogenetic, prin mobilizarea exagerată a lipidelor din adipocite şi formarea în cantităţi mari a acidului acetoacetic la nivel hepatic cu eliberarea sa în circulaţie. În aceste condiţii, poate apărea şi fenomenul de încărcare grasă hepatică. GH induce rezistenţă la insulină, printr-un mecanism încă neprecizat. Acesta atenuează efectul insulinei de stimulării captării şi utilizării glucozei de către adipocite şi fibrele musculare scheletice şi de a inhiba gluconeogeneza hepatică. Ca urmare, apare o creştere a nivelului glucozei plasmatice şi o intensificare compensatorie a secreţiei de insulină. În cazul unei secreţii excesive a GH, aceste efecte diabetogene ale hormonului pot induce modificări metabolice similare celor întâlnite la pacienţii cu diabet zaharat de tip II. Atât glucidele, cât şi insulina sunt indispensabile pentru acţiunea GH de promovare a creşterii organismului.

Efectele GH la nivel celular se traduc în efecte fiziologice la nivelul diverselor sisteme ale organismului. Asupra sistemului cardiovascular, GH acţionează crescând masa miocardică şi îmbunătăţind metabolismul energetic şi hemodinamica la nivel cardiac. GH modifică mărimea şi morfologia sistemului nervos central şi modulează funcţiile cognitive. Printre efecte se numără îmbunătăţirea memoriei de lungă durată, stimularea comportamentului matern şi o creştere a duratei somnului cu mişcări oculare rapide. La nivel renal, GH creşte rata filtrării glomerulare, reabsorbţia sodiului, fosfaţilor şi a apei, creşte sinteza reninei şi eritropoietinei şi activitatea 25-hidroxi-1-α-hidroxilazei (deci, producerea de calcitriol). De asemenea, GH este necesar în procesul de diferenţiere sexuală şi de maturare pubertală. Dimorfismul sexual poate fi atribuit stimulării diferenţiate a expresiei genice de către ritmurile diferite de secreţie hipofizară a GH la cele două sexe.

Multe din acţiunile GH sunt mediate de somatomedine, proteine mici sintetizate în principal la nivel hepatic sub acţiunea GH. Datorită similitudinii acestora cu proinsulina, şi a efectelor lor cu cele ale insulinei, aceste molecule au fost denumite şi factori de creştere asemănători insulinei (insulin-like growth factors, IGFs). Cea mai importantă este somatomedina C (denumită şi IGF-I). Spre deosebire de GH, care este slab legat de proteinele transportoare plasmatice şi are un timp scurt de înjumătăţire, IGF-I este puternic ataşat de o proteină transportoare (IGFBP) secretată în circulaţie tot sub acţiunea GH. Prin urmare, IGF-I este cedat lent către ţesuturi, având un timp de înjumătăţire de ~20 ore. În acest mod, acţiunea GH de stimulare a creşterii este substanţial prelungită prin intermediul IGF-I.

15.1.1.3 Reglarea secreției GH

La adult, eliberarea GH de la nivelul celulelor somatotrope hipofizare are loc într-o manieră pulsatilă. Copiii mici au o secreție nonpulsatilă a GH. Frecvența şi amplitudinea eliberării GH scad, iar secreția continuă diminuează, până când un aspect pulsatil al secreției GH apare înainte pubertății. În timpul copilăriei, există o creştere graduală a secreției GH pe 24 ore, iar amplitudinea pulsurilor GH creşte în timpul pubertății, probabil datorită efectului steroizilor gonadici asupra GHRH. Steroizii gonadici joacă un rol important în modularea ritmului secretor hipofizar al GH, estrogenii acționând la nivelul hipotalamusului şi crescând frecvența pulsurilor secreției GH. Acest fenomen determină apariția unui profil plasmatic al GH dependent de sex. Producerea GH continuă de-a lungul întregii vieți, dar diminuează cu vârsta la ambele sexe.

Valorile normale ale concentrației plasmatice a GH la adult sunt între 1,6 şi 3 ng/mL, iar la adolescent ~6 ng/mL.

Secreția GH este stimulată de diverşi factori legați de starea de nutriție a individului: înfometarea, în special asociată cu deficit proteic important, hipoglicemia, scăderea concentrației acizilor graşi liberi circulanți. GH este stimulat după mese bogate în proteine şi de către L-arginină. Noile metode de dozare a GH au demonstrat că, după administrarea unei doze de încărcare cu glucoză, nivelul GH este suprimat la femei sub 0,7 μg/L, iar la bărbați, sub 0,07 μg/L. Concentrația GH circulant este crescută după efort sau stres fizic, emoții puternice, traumatisme şi în sepsis. Nivele crescute de GH apar, de asemenea, la 1-2 ore după instalarea somnului adânc. Secreția GH este redusă la persoanele obeze, chiar dacă nivelul IGF-I este păstrat, sugerând o modificare a punctului de echilibru al sistemului de control prin feedback. Secreția totală de GH pe 24 ore este mai mare la femei decât la bărbați şi este crescută de terapia de substituție estrogenică.

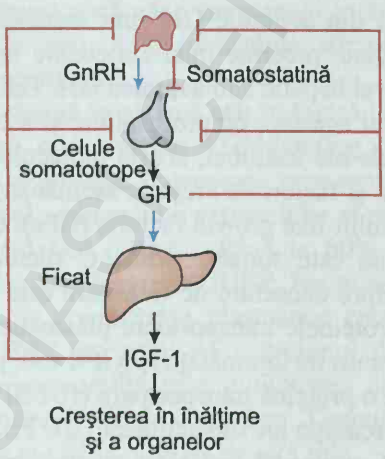


Figura 15.2. Rolul hipotalamusului şi al sistemelor de feedback în reglarea secreției hormonului de creştere

Secreția GH este indusă de către dopamină şi apomorfină (un agonist al receptorilor dopaminergici), precum şi de semnalizarea α-adrenergică. Blocantele β-adrenergice induc secreția bazală de GH şi cresc eliberarea GH stimulată de GHRH şi insulină.

Hipotalamusul controlează secreția hipofizară de GH prin intermediul a doi hormoni, somatoliberina (*growth hormone releasing hormone*, GHRH) şi somatostatina (*Figura 15.2*), care sunt transportați către celulele-țintă pe calea sistemului port hipotalamo-hipofizar. Dintre cei doi hormoni, rolul primordial îl are probabil GHRH. Acesta are un efect stimulator asupra celulelor somatotrope, atât pe termen scurt, cât şi pe termen lung: GHRH se fixează pe un receptor specific de pe suprafața celulară şi activează sistemul membranar al adenilat ciclazei, ceea ce are drept efect creşterea cantității intracelulare de cAMP. Efectul pe termen scurt este creşterea concentrației intracelulare de Ca^{2+}, cu stimularea fuziunii cu membrana celulară a veziculelor secretorii conținând GH, astfel producându-se secreția hormonului. Pe termen lung, apare o intensificare a transcripției genice, care are ca rezultat amplificarea sintezei GH. Somatostatina are un efect inhibitor asupra secreției GH. Ghrelina şi agoniştii sintetici ai receptorilor pentru peptide eliberatoare de hormon de creştere (*growth hormone releasing peptides*, GHRP) stimulează atât GHRH, cât şi direct secreția de GH.

Producția de GH este supusă unui mecanism de control prin feedback negativ (*Figura 15.2*), creşterea concentrației sale în circulație determinând diminuarea secreției. Nu este clar dacă această diminuare apare prin inhibiția GHRH sau prin creşterea somatostatinei.

15.1.1.4 Anomalii ale secreției şi/ sau răspunsului la GH

Deficitul de GH

Panhipopituitarism – este un termen care defineşte diminuarea secreției tuturor hormonilor adenohipofizari (*Tabelul 15.1*). Scăderea secreției poate fi congenitală sau poate apărea oricând pe

Tabelul 15.I. Principalele aspecte clinice în hipopituitarism

Hormonul	Aspecte ale deficitului
Hormonul de creştere	*Copii:* întârzierea creşterii *Adulţi:* masă şi forţă musculară scăzute, osteopenie, dislipidemii, tulburări de dispoziţie
Prolactina	Diminuarea secreţiei lactate
Hormonul tireotrop	Creştere ponderală, intoleranţă la frig, oboseală etc.
Hormonul corticotrop	Scădere în greutate, slăbiciune, hipotensiune, hipoglicemie, hipopigmentare cutanată, diminuarea pilozităţii pubiene şi axilare la femei
Hormonii gonadotropi	*Copii:* pubertate întârziată; *Femei:* oligomenoree, infertilitate, atrofia glandelor mamare şi a organelor genitale *Bărbaţi:* impotenţă, azoospermie, atrofie testiculară *Ambele sexe:* scăderea libidoului, scăderea pilozităţii corporale, riduri fine ale pielii
Vasopresina	Sete, poliurie

parcursul vieţii. Nu toţi hormonii adenohipofizei sunt afectaţi în aceeaşi măsură. De obicei, secreţia GH este prima care scade, urmată de LH/FSH, apoi de TSH şi, în cele din urmă, de ACTH. În general, secreţia GH este afectată indiferent de gradul severităţii hipopituitarismului.

Nanismul hipofizar – se datorează unui deficit de GH prezent în copilărie. Majoritatea cazurilor de nanism hipofizar apar secundar unei afectări generalizate a funcţiei adenohipofizei (panhipopituitarism). În general, toate părţile corpului se dezvoltă proporţionat, dar cu viteză mult redusă. La o persoană cu nanism panhipofizar nu apare pubertatea şi nu se produce maturarea funcţiilor sexuale. La o treime dintre pacienţii cu nanism hipofizar, deficitul de GH este izolat. La aceştia apare maturizarea sexuală şi pot avea copii. Aproximativ 10% dintre copiii cu deficit de GH au o mutaţie în gena care codifică acest hormon. Mutaţii în gena receptorului pentru GHRH sunt asociate cu nivele bazale scăzute ale GH care nu pot fi crescute după stimulare cu GHRH exogen, GHRP sau după hipoglicemia indusă de insulină. Defecte în structura sau sistemul de semnalizare al GH-R determină apariţia nanismului prin sensibilitate scăzută la GH (ex. sindromul Laron, care are un mod de transmitere autosomal recesivă). În acest caz, nivelul GH este normal sau crescut, iar nivelul IGF-I este scăzut şi nu răspunde la stimulare cu GH exogen. Multe dintre aceste mutaţii afectează domeniul extracelular ale GH-R şi, prin urmare, GHBP circulant este absent sau scăzut. În alt tip de nanism, întâlnit la pigmeii din Africa şi în sindromul Lévi-Lorain, rata de secreţie a GH este normală sau crescută, dar există o incapacitate ereditară de a sintetiza IGF-I, o etapă esenţială în promovarea creşterii de către GH.

Deficitul de GH apărut la adult apare de obicei datorită unor leziuni ale hipotalamusului sau celulelor somatotrope hipofizare. La aceşti pacienţi, compoziţia organismului se modifică, scăzând masa musculară şi crescând masa adipoasă, cu depozitare selectivă de lipide sub formă de grăsime abdominală viscerală. Pot fi asociate disfuncţia ventriculară stângă, hipertensiune arterială, hiperlipidemie şi fibrinogenemie crescută. Hipopituitarismul la adult este asociat cu un risc cardiovascular de trei ori mai mare decât la indivizii de aceeaşi vârstă.

Excesul de GH

Gigantismul – apare în cazul hipersecreţiei GH în copilărie. În această situaţie, toate ţesuturile organismului cresc rapid şi, pentru că, la această vârstă, zonele de creştere ale oaselor lungi sunt încă active, pacientul creşte exagerat în înălţime. Pacienţii cu gigantism au, de obicei, hiperglicemie şi aproximativ 10% dintre ei dezvoltă diabet zaharat manifest. În absenţa tratamentului, poate apărea hiposecreţia celorlalţi hormoni hipofizari, deoarece gigantismul este adesea produs de către o tumoră secretantă dezvoltată la nivelul hipofizei, care poate creşte până când sunt distruse celulele sănătoase ale glandei.

Acromegalia – este rezultatul hipersecreţiei de GH după vârsta adolescenţei, când creşterea

în lungime a oaselor lungi nu mai este posibilă, dar celelalte ţesuturi pot continua să crească. Este marcată mărirea dimensiunilor oaselor mâinilor şi picioarelor şi a oaselor membranoase (oasele craniului şi feţei) şi a unor porţiuni ale vertebrelor. Ţesuturile moi cresc în volum, fenomen manifestat în special la nivelul limbii, ficatului şi rinichilor. Impactul clinic cel mai important îl are afectarea sistemului cardiovascular. La aproximativ 30% din pacienţi se instalează boala coronariană, cardiopatie cu aritmii, hipertrofie ventriculară stângă, funcţie diastolică diminuată şi hipertensiune. Diabetul zaharat apare la 25% dintre pacienţii cu acromegalie, iar majoritatea manifestă toleranţă scăzută la glucoză datorită efectelor GH asupra metabolismului glucidic.

15.1.1.5 Investigaţii de laborator ale deficitului de GH

Investigaţii bazale

Secreţia GH este pulsatilă, iar durata sa de viaţă în circulaţie este scăzută. Prin urmare, între pulsurile secretorii hipofizare de GH, concentraţia serică a acestuia este sub nivelul de detecţie al majorităţii testelor convenţionale. Astfel, concentraţiile bazale de GH sunt de obicei nefolositoare în diagnosticul deficitului de hormon, deoarece acestea sunt adesea nedetectabile la individul normal.

Cele mai frecvent utilizate teste pentru evaluarea nivelelor circulante de GH sunt testele radioimune (RIA) şi cele imunometrice. Unele dintre aceste teste utilizează anticorpi policlonali, care au o specificitate mai mică şi dau rezultate mai mari comparativ cu testele care utilizează amestecuri de anticorpi monoclonali cu specificitate înaltă. Au fost raportate discrepanţe până la un factor de multiplicare de 2 sau chiar 4 între diversele teste disponibile.

Un nivel seric scăzut de IGF-I (comparat cu valorile normale corespunzătoare vârstei) este un predictor bun pentru deficitul sever de GH, dar IGF-I într-un interval normal nu exclude un deficit hormonal sever care ar putea răspunde la tratamentul de substituţie. Nivele scăzute de IGF-I pot fi întâlnite la copii sănătoşi, în special la cei cu vârstă sub 5 ani, dar şi la copii suferind de malnutriţie, hipotiroidism, insuficienţă renală, afecţiuni hepatice sau diabet zaharat.

Deşi determinările IGF-I şi IGFBP-3 pot avea importanţă în diagnosticul deficitului sever de GH şi au reproductibilitate mai bună decât testele de stimulare a GH, sensibilitatea şi specificitatea acestora sunt încă sub-optimale.

Teste de stimulare

Datorită interesului diagnostic scăzut pe care îl prezintă testele bazale, o multitudine de teste de stimulare pentru GH au fost dezvoltate. În funcţie de valoarea lor diagnostică, testele de provocare a secreţiei de GH au fost împărţite în două categorii: teste de screening (care includ testul de efort, testul cu levodopa şi cel cu clonidină) şi teste definitive (incluzând testele cu insulină, arginină şi glucagon). Deoarece secreţia GH este, în general, afectată la pacienţii cu hipofuncţie tiroidiană sau suprarenaliană, testele ar trebui efectuate la aceşti pacienţi numai după o terapie de substituţie adecvată.

Testele de provocare sunt costisitoare, pot avea efecte secundare şi trebuie efectuate *à jeun*, deoarece nivele crescute ale glucozei circulante inhibă secreţia de GH. Screeningul deficitului de GH la adulţi nu este recomandat decât dacă un tratament de substituţie cu GH ar putea fi recomandat, de exemplu, la pacienţi cu hipopituitarism la care toţi ceilalţi hormoni deficitari au fost substituiţi complet şi care încă acuză o „energie" şi o calitate a vieţii scăzute în mod inexplicabil.

Testele farmacologice de stimulare sunt nefiziologice, pot fi subiectul diverselor erori de laborator, sunt slab reproductibile, iar interpretarea lor se bazează pe definiţii arbitrare ale „normalului". De aceea, oricare dintre aceste teste poate produce rezultate eronate. În general, testele de stimulare a GH sunt considerate pozitive dacă, în timpul efectuării lor, nivelul GH circulant nu creşte peste 3 ng/mL. Datorită sensibilităţii şi specificităţii lor scăzute şi pentru excluderea copiilor sănătoşi care pot avea rezultate anormale la un singur test, este recomandată efectuarea a două teste de stimulare, fie în combinaţie, fie consecutiv. Totuşi, aceste proceduri pot să nu detecteze defectele minore prezente în mecanismul de reglare a secreţiei GH.

Testul de toleranţă la insulină

Este considerat standardul de aur pentru testele de stimulare a secreţiei de GH.

- *Mecanism de acţiune:* hipoglicemia indusă provoacă secreţia de GH la nivel maximal. De asemenea, hipoglicemia determină şi eliberarea de cortizol, ceea ce face ca acest test să poată fi utilizat şi pentru evaluarea rezervei funcţionale a corticosuprarenalelor.

- *Dozaj şi administrare:* insulină simplă 0,1 U/kgc, în bolus IV.
- *Recoltarea probelor:* 0, 15, 30, 45, 60 şi 120 min.
- *Particularităţi de interpretare:* pentru ca testul să fie considerat valid, glicemia trebuie să scadă la un nivel de sub 50% din valoarea iniţială sau la mai puţin de 40 mg/dL.
- *Precauţii.* Au fost raportate decese în timpul efectuării acestui tip de test. Hipoglicemia severă poate conduce la apariţia convulsiilor şi a sechelelor neurologice, motiv pentru care testul nu este recomandat copiilor cu vârsta sub 5 ani. Testul este, de asemenea, contraindicat la vârstnici şi la pacienţii cu diabet, boală coronariană ischemică, boli cerebrovasculare sau epilepsie.

Clonidina – agonist α2-adrenergic, creşte secreţia GHRH şi inhibă somatostatina. Riscul de apariţie a hipotensiunii impune monitorizarea tensiunii arteriale în timpul testului.

Levodopa – agonist α-adrenergic, creşte secreţia de GHRH.

Arginina – inhibă secreţia de somatostatină şi induce secreţia de glucagon.

Glucagonul – induce hiperglicemie, cu provocarea secreţiei de insulină şi apariţia ulterioară a unei hipoglicemii reactive moderate. Efectuarea testului presupune existenţa unor rezerve normale de glicogen în organismul pacientului. În plus, glucagonul inhibă secreţia de somatostatină. Testul poate fi efectuat în siguranţă chiar şi la sugari şi la copii mici.

GHRH – stimulează în mod direct celulele somatotrope, iar utilizarea lui permite evaluarea directă a capacităţii lor secretorii. Totuşi, în practică se observă o mare variabilitate intra- şi interindividuală a răspunsului la administrarea GHRH, probabil datorită nivelelor diverse ale somatostatinei endogene. În scopul reducerii acestei variabilităţi, simultan cu GHRH se poate administra un inhibitor al somatostatinei endogene, precum arginina.

- *Dozaj şi administrare:* GHRH, 1 μg/kgc, intravenos, în decurs de 1 min.
- *Recoltarea probelor:* 0, 15, 30, 45 şi 60 min.

Testul de efort – este efectuat după un repaus alimentar de 3-4 ore şi constă în efectuarea unui efort fizic moderat timp de 20 minute. Pentru ca testul să fie valid, frecvenţa cardiacă la sfârşitul testului trebuie să depăşească 120 contracţii/min. Recoltarea probelor se face la 20 şi 40 min. Până la 30% dintre copiii sănătoşi nu răspund la acest test prin creşterea GH.

15.1.1.6 Investigaţii de laborator ale excesului de GH

Teste bazale

În acromegalie, nivelele serice de IGF-I ajustate pentru vârstă şi sex sunt crescute. Ca şi în cazul deficitului, determinările nesistematizate ale nivelului de GH circulant nu sunt utile nici pentru diagnosticul excesului de GH, datorită caracterului pulsatil al secreţiei acestuia.

Teste de supresie

La indivizii sănătoşi, nivele crescute ale glicemiei suprimă secreţia de GH. Absenţa supresiei concentraţiei serice a GH sub 1 ng/mL în timpul unui test de toleranţă la glucoză administrată pe cale orală (75 g) confirmă diagnosticul de acromegalie.

15.1.2 Prolactina

Gena prolactinei este situată pe cromozomul 6 şi are o homologie de aproximativ 40% cu gena GH şi a lactogenului placentar uman. Aceste trei gene derivă dintr-o genă comună ancestrală. Prolactina (PRL) este un hormon polipeptidic, format dintr-un singur lanţ de 198 aminoacizi, cu o masă moleculară de 23 kDa. Conformaţia tridimensională este alcătuită din 4 regiuni α-helix antiparalele organizate după un model „sus-sus-jos-jos". Această structură este asemănătoare cu a interferonului şi a câtorva interleukine.

Diverse variante de PRL sunt formate prin mecanisme transcripţionale sau translaţionale, crescând specificitatea biologică şi diversitatea PRL. Majoritatea variantelor apar în urma modificărilor posttranslaţionale – dimerizare, agregare, proteoliză sub acţiunea kallicreinei şi catepsinei D, N-glicozilare la nivelul Asp31 şi fosforilare la nivelul resturilor de serină şi treonină. Unele variante păstrează acţiunea PRL, altele au funcţii unice, de exemplu antiangiogenică, sau încă neidentificate.

Macroprolactina este un complex cu masă moleculară mare format din IgG şi prolactină, care are o activitate biologică scăzută. Macroprolactinemia este un fenomen relativ frecvent la pacienţii cu hiperprolactinemie. Pentru a li se asigura depistarea şi tratamentul adecvat, toţi pacienţii cu hiperprolactinemie semnificativă ar trebui testaţi pentru prezenţa macroprolactinei, deoarece, în ab-

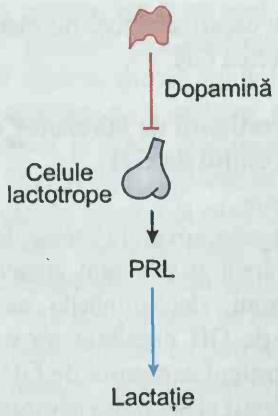


Figura 15.3. Reglarea de către hipotalamus a secreţiei prolactinei

senţa amenoreei şi a hipogonadismului, aceştia nu necesită terapie cu agonişti dopaminergici.

15.1.2.1 Secreţia PRL

PRL este sintetizată în celulele lactotrope, care cuprind aproximativ 20-30% din celule hipoifizei anterioare. Celulele lactotropele şi somatotrope sunt derivate dintr-un precursor comun care poate da naştere la o tumora secretantă atât de PRL, cât şi de GH. Spre deosebire de majoritatea celulelor hipofizare, lactotropele păstrează o capacitate proliferativă marcată la adult şi o hiperplazie accentuată a acestora apare pe parcursul ultimelor două trimestre de sarcină şi primelor luni de alăptare. PRL poate fi sintetizată şi în alte ţesuturi normale în afara hipofizei, precum decidua, sistemul imun, creierul şi miometrul. Carcinoamele renale şi pulmonare pot fi, de asemenea, surse de secreţie ectopică de PRL.

PRL este prezentă în majoritatea fluidelor organismului, inclusiv în lapte şi lichidul cefalorahidian. Nivelele serice normale la adult sunt de 10-25 μg/L la femei şi 20 μg/L la bărbaţi. Secreţia PRL este pulsatilă, cu nivelul secretor maxim în timpul somnului cu mişcări rapide ale glubilor oculari. Concentraţii serice maxime, de până la 30 μg/L, sunt înregistrate dimineaţa, între orele 4 şi 6.

Secreţia de prolactină este controlată, în principal, printr-un factor hipotalamic inhibitor, dopamina (*Figura 15.3*). Acest fapt explică de ce deficitul de PRL este rar şi de ce orice boală care afectează anatomia hipofizei şi fluxul sângelui prin sistemul port hipofizar, poate fi asociat cu hiperprolactinemie. Acţionând prin intermediul receptorilor dopaminergici de tip 2, dopamina exercită multiple efecte asupra celulelor lactotrope, inclusiv scăderea nivelelor intracelulare de calciu şi AMPc, inhibiţia expresiei genei prolactinei şi a eliberării hormonului şi supresia proliferării celulare. La rândul său, prin intermediul unui sistem de feedback negativ, PRL este factorul principal de reglare a sistemului dopaminergic.

Celulele lactotrope posedă receptori de suprafaţă pentru TRH, iar acest tripeptid hipotalamic poate induce eliberarea de PRL chiar şi în prezenţa dopaminei. Importanţa TRH în fiziologia prolactinei nu este însă clară. Atât peptidul vasoactiv intestinal (VIP), cât şi oxitocina sunt prezente în circulaţia hipofizară în concentraţii care fluctuează în paralel cu descărcările de PRL. Receptori pentru ambele peptide sunt prezenţi pe membrana celulelor lactotrope şi ambii hormoni stimulează eliberarea de PRL *in vitro*. În prezenţa dopaminei însă, aceştia nu exercită nici un efect secretor asupra PRL. *In vivo*, aceştia stimulează secreţia PRL în condiţiile scăderii nivelului dopaminei la nivel hipofizar şi contribuie la creşterea secreţiei PRL observate în condiţii fiziologice precum lactaţia şi stresul. Endotelina are o acţiune bifazică asupra secreţiei PRL *in vitro*, caracterizată printr-un efect stimulator tranzitoriu, urmat de o inhibiţie mai îndelungată şi mai profundă a secreţiei hormonului. Totuşi, relevanţa fiziologică a acestor efecte farmacologice ale endotelinei nu a putut fi demonstrată, deoarece animalele cu deleţie a genei endotelinei prezintă afectări multiple, care împiedică studiul efectului asupra PRL. Estrogenii stimulează secreţia PRL traversând liber membrana celulară şi legându-se de receptorii pentru estrogeni, care dimerizează şi acţionează ca factor de transcripţie. Dintre factorii de creştere, EGF şi insulina stimulează expresia genei PRL, iar TGF-β o inhibă. Glucocorticoizii şi hormonii tiroidieni diminuează uşor secreţia PRL. Prolactina plasmatică este crescută în hipotiroidism.

Reglarea sintezei şi secreţiei PRL în ţesuturile extrahipofizare este, în mare măsură, necunoscută. Se ştie însă că eliberarea PRL din aceste situri nu răspunde la dopamină, estrogeni sau neuropeptide, fiind reglată prin factori autocrini sau paracrini. Agoniştii dopaminergici, precum cabergolina, nu suprimă secreţia PRL din carcinoamele renale şi pulmonare secretante, în contrast cu efectul lor asupra tumorilor hipofizare.

Nivelul seric al PRL creşte după efort fizic, alimentaţie, activitate sexuală, infarct miocardic acut, intervenţii chirurgicale, hipoglicemie. În sarcină, glalnda hipofiză creşte cu până la 135%,

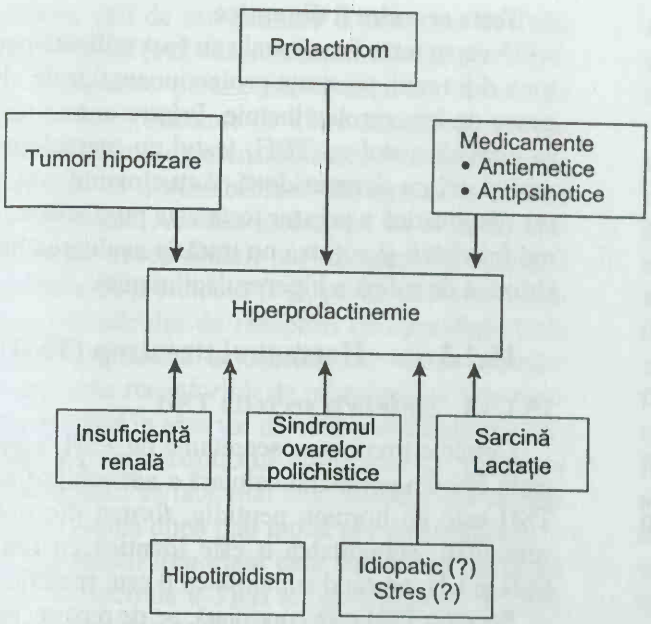


Figura 15.4. Principalele cauze de hiperprolactinemie

iar nivelul plasmatic al PRL creşte de până la 10 ori. Suptul activează căi de semnalizare nervoasă aferente în hipotalamus, care induc eliberare de prolactină. Cu timpul, răspunsul PRL la supt diminuează, iar nivelele PRL revin la normal.

15.1.2.2 Acţiunea prolactinei

Pentru a induce răspunsurile specifice la nivelul celulelor ţintă, prolactina se leagă la receptori membranari specifici. Receptorul pentru PRL este exprimat în majoritatea ţesuturilor, nivelele de expresie cele mai mari găsindu-se la nivelul ficatului şi glandei mamare. Receptorul pentru PRL aparţine superfamiliei receptorilor pentru citokine, la fel ca şi receptorul pentru GH şi IL-6. În urma legării PRL la receptor, acesta dimerizează, formând un complex activ care nu are activitate tirozin kinazică intrinsecă, ci utilizează calea de semnalizare JAK2 (*Janus kinase 2*) – STAT (molecule de traducere a semnalului şi activare a transcripţiei, *signal transducers and activators of transcription*). De asemenea, GH şi lactogenul placentar uman interacţionează cu mare afinitate cu receptorul prolactinei, mimând unele dintre efectele prolactinei.

Principala ţintă a PRL este glanda mamară. Împreună cu alţi hormoni, PRL stimulează creşterea şi diferenţierea epiteliului mamar. PRL participă la inducerea şi menţinerea lactaţiei. La nivelul ovarului, PRL inhibă foliculogeneza şi activitatea aromatazei din celulele granuloasei, iar în concentraţii mari conduce la hipoestrogenism şi anovulaţie. PRL scade durata fazei luteale a ciclului menstrual, având efect luteolitic. Astfel, o bună parte din acţiunile hormonului sunt menite să împiedice întreruperea lactaţiei prin apariţia unei noi sarcini. PRL reduce funcţia reproducătoare. În afara diminuării steroidogenezei gonadice, atât la femei, cât şi la bărbaţi, PRL scade eliberarea GnRH hipotalamic şi a hormonilor hipofizari gonadotropi. La bărbaţi, hiperprolactinemia conduce la scăderea nivelului de testosteron şi a spermatogenezei, reducând fertilitatea la aceşti pacienţi. PRL are, de asemenea, efecte mitogenice, secretorii şi morfogenice asupra prostatei. PRL stimulează proliferarea insulelor pancreatice şi creşte secreţia de insulină în timpul sarcinii.

15.1.2.3 Anomalii ale secreţiei PRL

Hiperprolactinemia

Hiperprolactinemia este sindromul hipersecretor hipofizar cel mai frecvent întâlnit. Diverse situaţii fiziologice sau patologice sunt asociate cu apariţia hiperprolactinemiei (*Figura 15.4*): sarcina şi alăptarea, insuficienţa renală cronică, afecţiuni hepatice şi tiroidiene. Diverse medicamente cresc eliberarea de PRL: contraceptivele orale, unele antihipertensive (de ex., verapamilul, metildopa, rezerpina), unele antihistaminice (antagoniştii H_2, precum cimetidina şi ranitidina), agoniştii opioizi, antagoniştii receptorilor dopaminergici D_2 (incluzând o multitudine de compuşi psihoactivi) şi majoritatea antiemeticelor (ex. metoclopramid, proclorperazină). Noile neuroleptice „atipice" (ex. olanzapina) nu determină creşterea nivelului PRL circulante.

Leziuni ale regiunii hipotalamo-hipofizare care conduc la diminuarea nivelelor de dopamină disponibile la nivel hipofizar sunt însoţite de obicei de creşteri ale nivelelor prolactinei circulante până la 30-100 µg/L. Unele adenoame hipofizare secretante de GH, întâlnite în acromegalie, pot secreta şi PRL. Principala cauză a creşterii prolactinemiei peste 100 µg/L sunt prolactinoamele, adenoame hipofizare secretante de PRL.

Aspectele clinice cele mai frecvente asociate cu hiperprolactinemia la femei sunt amenoreea, galactoreea şi infertilitatea. Aceste semne pot fi însoţite de scăderea libidoului, creştere ponderală şi hirsutism moderat. La bărbaţi, hiperprolactinemia se însoţeşte de disfuncţie erectilă şi oligospermie. Galactoreea este rară.

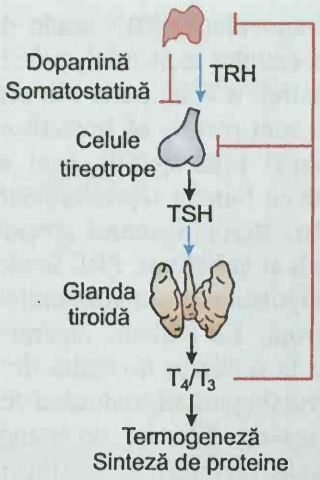


Figura 15.5. Reglarea secreției hormonului tireotrop

Hipoprolactinemia izolată

Este rară şi a fost descrisă la femei la care lipseşte secreția lactată după naştere. Nivelele prolactinei sunt scăzute şi nu cresc după teste de stimulare a secreției, precum testul cu TRH.

15.1.2.4 Aspecte particulare ale explorării concentrației prolactinei circulante

Efectul de post-zonă

Uneori, în cazul unor prolactinoame hipofizare mari, concentrații extrem de ridicate ale PRL pot depăşi intervalul de linearitate al curbei de calibrare a testelor omogene utilizate pentru dozarea PRL, ceea ce conduce la obținerea unei valori doar cu puțin crescute, care nu reflectă prolactinemia reală a pacientului. Prezența acestui efect poate fi identificată prin repetarea testului, utilizând ca probă un eşantion de ser diluat. Atunci când „efectul de cârlig" este prezent, valoarea prolactinemiei obținută din serul diluat este mai mare decât cea obținută din serul nediluat.

Macroprolactinemia

Deşi PRL care circulă în sânge legată de imunoglobuline, sub formă de macroprolactină, nu are activitate biologică, aceasta este, într-o măsură variabilă, recunoscută de testele imunologice utilizate curent pentru dozarea PRL. La unele persoane, nivelul macroprolactinei poate depăşi considerabil nivelul PRL libere, iar rezultatele testelor de laborator să indice o falsă hiperprolactinemie. Macroprolactina din eşantionul biologic poate fi îndepărtată în laborator prin precipitare cu polietilenglicol sau prin cromatografie prin filtrare în gel.

Teste secretorii dinamice

Diverse teste funcționale au fost utilizate pentru a diferenția prezența prolactinoamelor de alte cauze de hiperprolactinemie. Printre aceste teste se numără testul cu TRH, testul cu metoclopramid şi cel cu domperidonă. Actualmente, valoarea diagnostică a acestor teste este pusă sub semnul întrebării şi acestea nu intră în evaluarea biochimică de rutină a hiperprolactinemiei.

15.1.3 Hormonul tireotrop (TSH)

15.1.3.1 Sinteza şi secreția TSH

Celulele tireotrope, secretante de TSH, reprezintă 5% din populația celulară a adenohipofizei. TSH este un hormon peptidic, format din două subunități: subunitatea α este identică cu cea a FSH şi LH, pe când subunitatea β este specifică.

Secreția TSH este controlată, pe de o parte, prin acțiunea stimulatoare a TRH, iar, pe de altă parte, prin efectul supresor al hormonilor tiroidieni, dopaminei, somatostatinei şi a glucocorticoizilor, care inhibă inducerea mediată de TRH (*Figura 15.5*).

TRH este un hormon hipotalamic cu structură simplă, tripeptidică, care ajunge la hipofiza anterioară pe calea sistemului port hipotalamo-hipofizar. Când fluxul sanguin prin acest sistem este blocat, rata secreției TSH scade dramatic. Mecanismul prin care TRH stimulează secreția la nivelul celulelor tireotrope începe prin legarea hormonului la receptorii specifici membranari de pe suprafața acestor celule. Aceasta este urmată de activarea proteinelor Gq sau G_{11} şi a sistemului PIP_2-PLC, cu formarea consecutivă de IP_3 şi 1,2-DAG. IP_3 determină creşterea nivelului intracelular de Ca^{2+} prin eliberarea acestuia din reticulul endoplasmic, iar 1,2-DAG activează PLC. Creşterea Ca^{2+} intracelular este accentuată prin activarea canalelor ionice membranare, care permit influxul ionilor de Ca^{2+} extracelulari. Creşterea Ca^{2+} intracelular are drept efect activarea protein kinazei Ca^{2+}/calmodulin-dependente, cu rol în reglarea transcripției genice în celulele hipofizare. TRH activează, de asemenea, protein kinazele activate de mitogeni (MAPKs), efect parțial secundar activării PKC şi potențat prin acțiunea subunității dimerice βγ a proteinelor G. Setul de gene controlate de către aceste protein kinaze după stimularea cu TRH, în afară de cele implicate în sinteza şi secreția hormonală, nu este complet definit. Un efect important al activării PKC este acela de feedback negativ, cu in-

hibarea căii de semnalizare dependente de PIP_2, consecutivă fosforilării receptorului pentru TRH.

Stimularea persistentă a celulelor tireotrope prin nivele constante de TRH determină apariţia fenomenului de desensibilizare. Principalele mecanisme de desensibilizare acţionează la nivelul receptorului. Acestea includ, pe de o parte, fosforilarea receptorului, cu diminuarea cuplării acestuia cu proteinele G şi, pe de altă parte, scăderea numărului de receptori de suprafaţă. Cele două mecanisme acţionează cu viteze diferite: decuplarea receptorilor de proteinele G este rapidă, apărând în interval de câteva secunde sau minute, pe când controlul numărului de receptori membranari se face mai lent, acesta fiind semnificativ numai după mai multe ore de stimulare.

Un stimul important care determină creşterea ratei de secreţie a TRH şi, prin urmare, a TSH, este expunerea la frig. Acest efect apare prin stimularea centrilor termoreglatori hipotalamici. Un efect opus este observat în cazul situaţiilor emoţionale în care este stimulat sistemul nervos simpatic, precum excitaţia şi anxietatea. Acestea determină o scădere a secreţiei TSH, probabil prin stimularea metabolismului şi creşterea temperaturii corpului.

O creştere a nivelului circulant de hormoni tiroidieni determină diminuarea secreţiei de TSH, prin declanşarea unui mecanism de feedback negativ mediat în principal prin intermediul T3 obţinut la nivelul celulelor tireotrope din T4 care pătrunde liber la acest nivel.

TSH are o secreţie pulsatilă, dar vârfurile secretorii au o amplitudine mai mică decât în cazul altor hormoni hipofizari. TSH are o durată de viaţă în torentul sanguin relativ lungă. Prin urmare, concentraţia TSH circulant variază puţin în timpul zilei. Variaţia de-a lungul a 24 ore implică un vârf de secreţie în timpul nopţii şi un minim în timpul zilei, între orele 10 şi 16. Raportul de doar aproximativ 2 între valorile maxime şi minime în 24 ore este inclus în intervalul relativ larg de valori de referinţă pentru populaţia generală (între ~0,4 şi 4,0 mIU/L). În plus, momentul uzual de recoltare a sângelui la pacienţii din ambulatoriu, dimineaţa, se suprapune peste perioada de variaţie minimă a concentraţiei TSH circulant. De aceea, o singură determinare de laborator este suficientă pentru evaluarea nivelului TSH.

Pentru pacienţii adulţi din ambulatoriu, intervalele de referinţă pentru testele tiroidiene nu sunt practic influenţate de variabile precum vârsta, sexul, rasa, faza ciclului menstrual, fumatul, activitatea fizică sau alimentaţia înaintea recoltării probei de sânge.

La copii, pe măsura maturării axului hipotalamo-hipofizo-tiroidian, se observă o scădere continuă a raportului TSH/ fT4 de la jumătatea vieţii intrauterine până la încheierea pubertăţii. Prin urmare, valorile TSH sunt mai mari la copii. De aceea, intervalele de valori normale la copii trebuie ajustate în funcţie de vârstă. Deoarece rezultatele determinărilor TSH şi fT4 diferă semnificativ de la o metodă la alta şi pentru că majoritatea producătorilor nu au stabilit intervale de referinţă specifice pentru diverse vârste, limitele acestor intervale pot fi calculate pentru diversele teste ajustând limita superioară şi pe cea inferioară a intervalului de referinţă pentru adulţi cu un anumit raport specific între valorile TSH la copii şi la adulţi (v. *Tabelul 15.II*).

În timpul sarcinii, datorită activităţii tireostimulatoare a hCG, care are omologie structurală cu TSH, apare o scădere a nivelelor serice ale TSH în timpul primului trimestru. Efectul maxim este observat în săptămânile 10-12 de sarcină, în timpul vârfului de secreţie a hCG. Astfel, la aproximativ 20% dintre sarcinile normale pot fi întâlnite nivele de TSH seric sub valorile normale.

În general, nivelul seric al TSH este mai puţin afectat decât cel al hormonilor tiroidieni de administrarea medicamentelor. Glucocorticoizii în doze mari pot diminua nivelul seric al T3 şi inhiba secreţia TSH. Dopamina inhibă, de asemenea, secreţia TSH şi poate masca nivelul crescut al TSH din hipotiroidismul primar la pacienţii spitalizaţi trataţi cu acest medicament.

15.1.3.2 Efectele TSH

La om, TSH acţionează prin intermediul unui receptor membranar specific, exprimat numai pe suprafaţa tireocitelor. Receptorul pentru TSH aparţine familiei de receptori cu şapte domenii transmembranare. Acesta este capabil să activeze cel puţin trei efectori: proteinele Gs, Gq şi Gi. La rândul său, Gs activează adenilat ciclaza, care generează cAMP din ATP. Gq activează fosfolipaza C β, care generează IP_3 şi DAG pornind de la PIP_2. Gi inhibă adenilat ciclazele (*vezi şi Capitolul 14.1.4.1*).

Activitatea biologică a TSH nu este datorată însă scheletului proteic, ci gradului de glicozilare, mai precis de sialilare a moleculei hormonului. Se pare că o secreţie adecvată de TRH este

esenţială pentru obţinerea unei sialilări normale a TSH şi pentru asocierea subunităţilor TSH pentru a forma moleculele mature, biologic active. Activitatea biologică a TSH la pacienţii cu hipotiroidism central este în relaţie inversă cu gradul de sialilare a moleculei sale.

TSH exercită un efect pozitiv asupra creşterii glandei tiroide. În absenţa TSH, apărută fie printr-o afecţiune hipofizară, fie consecutiv tratamentului cu hormoni tiroidieni, glanda tiroidă devine hipoplazică, datorită scăderii dimensiunii şi numărului tireocitelor. Invers, excesul de TSH determină hipertrofia tiroidei şi apariţia guşei. La nivel tiroidian, TSH stimulează sinteza de ADN şi are activitate mitogenă. Pentru apariţia acestor efecte ale TSH este necesară şi prezenţa IGF-I. Deşi TSH este principalul factor care controlează volumul tiroidei în viaţa extrauterină, hormonul nu este necesar pentru diferenţierea şi dezvoltarea glandei în primele etape ale vieţii intrauterine.

De asemenea, TSH stimulează toate mecanismele implicate în activitatea secretorie a celulelor glandulare tiroidiene. TSH determină creşterea proteolizei tireoglobulinei stocate în foliculii tiroidieni, stimularea activităţii pompei de iod, cu creşterea nivelului de iod captat la nivel glandular, intensificarea procesului de iodare a tirozinei şi modificări morfologice ale epiteliului tiroidian care cresc suprafaţa de contact dintre tireocite şi coloidul prezent în foliculi.

15.1.3.3 Anomalii ale secreţiei sau răspunsului la TSH

Hipersecreţia/ hiperfuncţia TSH

Adenoamele hipofizare secretante de TSH sunt rare. Tipic, pacienţii prezintă semne clinice şi biochimice moderate de tireotoxicoză, cu valori uşor crescute sau chiar aparent „normale" ale TSH plasmatic.

În lipsa depistării unui adenom hipofizar la investigaţiile imagistice, trebuie luată în considerare posibilitatea existenţei unei erori de determinare a nivelelor circulante de T4 şi/sau TSH (situaţia cel mai frecvent întâlnită) sau a unei mutaţii la nivelul receptorului pentru hormoni tiroidieni care cauzează rezistenţă generalizată sau selectivă la acţiunea hormonilor tiroidieni. În literatură este, de asemenea, amintit un sindrom destul de vag definit de „secreţie inadecvată de TSH de cauză non-neoplazică". Spre deosebire de majoritatea pacienţilor cu adenoame secretante de TSH, pacienţii cu mutaţii la nivel de receptor şi cei cu secreţie inadecvată de TSH de cauză non-neoplazică" răspund prin creşterea nivelului de TSH la stimularea cu TRH sau prin supresia parţială a T4 şi TSH după administrare de T3 liber. Sindromul de rezistenţă de cauză genetică la TSH poate fi diagnosticat prin analiza genei receptorului pentru hormoni tiroidieni sau prin evaluarea funcţiei tiroidiene la membrii familiei pacientului. În cazul prezenţei unui adenom secretant de TSH, nivelul subunităţii α a TSH este tipic crescut.

Hiperfuncţia TSH mai poate apărea, în afara hipersecreţiei, în cazul unor mutaţii congenitale activatoare ale receptorului pentru TSH şi în prezenţa anticorpilor stimulatori capabili să se ataşeze la receptor. Anticorpii stimulatori par să se lege de porţiunea N-terminală a domeniului extracelular al receptorului şi să mimeze acţiunea TSH, cu declanşarea semnalizării post-receptor şi stimularea celulelor.

Hiposecreţia/ Deficitul de TSH

Deficitul de TSH conduce la apariţia hipotiroidismului de cauză centrală, caracterizat prin aspecte clinice similare cu cele din hipotiroidismul primar, dar de severitate mai mică. În hipotiroidismul de cauză hipofizară, TSH are un nivel circulant bazal scăzut, în condiţiile unor concentraţii mici de hormoni tiroidieni. Prin contrast, în hipotiroidismul de cauză hipotalamică, poate exista un nivel normal sau uşor ridicat de TSH, dar, în acest caz, TSH produs are activitate biologică scăzută, probabil datorită afectării procesului de glicozilare.

Răspunsul tiroidei la acţiunea TSH poate fi diminuat în cazul existenţei unor mutaţii inactivatoare la nivelul receptorului pentru TSH. Mutaţiile la nivelul receptorului pot induce grade variate de rezistenţă la acţiunea hormonului. În acest caz, pacienţii au hipertireotropinemie şi trebuie făcut diagnosticul diferenţial cu hipotiroidismul primar. Totuşi, pacienţii cu rezistenţă la TSH nu dezvoltă guşă, iar boala este moştenită, de obicei, după un model autozomal recesiv. Prezenţa anticorpilor inhibitori faţă de receptorul TSH poate induce, de asemenea rezistenţă la acţiunea hormonului.

Mutaţii activatoare somatice ale receptorului pentru TSH determină apariţia unui adenom tiroidian hiperactiv care, prin secreţia excesivă de hormoni, deprimă nivelul circulant de TSH şi activitatea celulelor tiroidiene neafectate de mutaţie.

15.1.3.4 Explorarea de laborator a secreţiei TSH

Majoritatea metodelor actuale de determinare a concentraţiei TSH pot atinge o sensibilitate funcţio-

nală (*v. subcapitolul 15.1.3.5*) de 0,02 mUI/L sau mai jos, care reprezintă o limită de detecţie necesară pentru a acoperi întregul interval de valori întâlnite atât în hipo-, cât şi în hipertiroidism. Astfel a devenit posibilă distincţia între supresia profundă a TSH din boala Graves (TSH < 0,01 mUI/L) şi supresia TSH (TSH = 0,01 – 0,1 mUI/L) observată la pacienţii cu hipertiroidism subclinic.

Nivelele anormale ale TSH la pacienţi eutiroidieni sunt rezultatul unor afecţiuni non-tiroidiene sau sunt secundare administrării unor medicamente care interferă cu sinteza sau secreţia hormonului.

Screeningul pentru disfuncţii tiroidiene la pacienţii din ambulatoriu

Majoritatea societăţilor profesionale recomandă determinarea TSH pentru depistarea pacienţilor cu disfuncţie tiroidiană proveniţi din ambulatoriu. TSH este preferat faţă de fT4, datorită relaţiei log-lineare dintre TSH şi fT4 care are drept consecinţă faptul că numai prin determinarea TSH se poate identifica un exces sau deficit subclinic de hormoni tiroidieni. Condiţia esenţială pe care trebuie să o îndeplinească testul este să aibă o sensibilitate funcţională mai mică de 0,02 mUI/L. Testele mai puţin sensibile pot da rezultate fals negative (în intervalul normal) în cazul probelor cu concentraţii ale TSH sub valorile normale. Screeningul prin intermediul TSH are, totuşi două limitări, şi anume: se presupune că funcţia sistemului hipotalamo-hipofizar este intactă şi, în al doilea rând, se presupune că funcţia tioidiană a pacientului este stabilă, adică nu a urmat o terapie recentă pentru hipo- sau hipertiroidism.

Supravegherea terapiei de substituţie cu L-T4

Ţinta terapeutică în timpul tratamentului de substituţie cu L-T4 pentru hipotiroidismul primar este o valoare a TSH seric între 0,5 şi 2 mUI/L. O asociere paradoxală a unor valori crescute de fT4 şi TSH la un pacient cu terapie de substituţie cu L-T4 este sugestivă pentru noncomplianţa terapeutică. Administrarea L-T4 de către pacient doar înainte de vizita de control la medic, după o perioadă lungă de neadministrare a medicamentului, determină creşterea nivelului circulant al fT4 la valorile terapeutice, dar nu determină normalizarea valorilor TSH, datorită existenţei unei latenţe în apariţia supresiei TSH.

Determinarea nivelului seric al TSH la pacienţii spitalizaţi

La pacienţii spitalizaţi, cu afecţiuni non-tiroidiene, nivelele de TSH se pot afla în afara intervalului de valori normale, variind între 0,02 şi 20 mUI/L. Este necesară utilizarea unor teste cu sensibilitate funcţională mai mică de 0,02 mUI/L, pentru a deosebi aceşti pacienţi cu supresie moderată a TSH şi fără afecţiuni tiroidiene, de cei cu hipertiroidism şi supresie severă a TSH (< 0,02 mUI/L). Datorită variaţiei nivelelor TSH la pacienţii spitalizaţi, este bine să fie evitată, pe cât posibil, evaluarea tiroidiană de rutină la această categorie de pacienţi.

Determinarea de laborator a anticorpilor anti-receptor de TSH

Determinarea anticorpilor anti-receptor de TSH (TRAb) poate fi utilă în predicţia unei disfuncţii tiroidiene la făt sau nou-născut, în cazul femeilor însărcinate, care au un istoric de boală tiroidiană autoimună. Între 2 şi 10% dintre femeile gravide cu nivele foarte crescute de TRAb nasc copii cu hipertiroidism.

Femeilor însărcinate care urmează o medicaţie antitiroidiană pentru boala Graves ar trebui să li se determine TRAb în trimestrul trei de sarcină. Detectarea unor nivele crescute de TRAb la aceste paciente ar trebui să conducă la efectuarea unei evaluări ample clinice şi biochimice a nounăscutului pentru depistarea hipertiroidismului, atât la naştere (prelevare de sânge din cordonul ombilical), cât şi la 4-7 zile, după ce efectele trecerii transplacentare a medicamentelor antitiroidiene au dispărut. Este recomandat să fie testată prezenţa atât a anticorpilor stimulatori, cât şi a celor blocanţi, deoarece expresia disfuncţiei tiroidiene poate fi diferită la copil faţă de mamă.

15.1.3.5 Aspecte particulare ale explorării de laborator a secreţiei TSH

Majoritatea variabilelor preanalitice au un efect mic asupra determinărilor de TSH.

TSH, la fel ca şi hormonii tiroidieni, este stabil în serul păstrat la temperatura camerei, refrigerat sau congelat. De asemenea, TSH şi TT4 din picăturile de sânge integral uscate pe hârtie de filtru, utilizate pentru screeningul hipotiroidismului neonatal, sunt stabile timp de mai multe luni dacă sunt conservate în prezenţa unui desicant.

Specificitatea testelor de determinare a TSH

TSH este un hormon heterogen, în sânge circulând diverse izoforme. De asemenea, aceste izoforme sunt prezente şi în extractele hipofizare utilizate pentru standardizarea testelor.

Metodele imunometrice moderne bazate pe anticorpi monoclonali au eliminat practic problema de reactivitate încrucişată cu alţi hormoni gli-

coproteici existentă în primele generaţii de teste. Aceste noi metode pot detecta însă diverşi epitopi ai unor izoforme anormale secretate de către unii pacienţi eutiroidieni sau în cazul prezenţei unor anomalii hipofizare. De exemplu, indivizii cu hipotiroidism de cauză centrală, produs prin disfuncţie hipofizară sau hipotalamică, secretă izoforme de TSH anormal glicozilate, cu activitate biologică diminuată. Majoritatea metodelor detectează aceste izoforme şi generează rezultate paradoxal normale sau chiar crescute pentru TSH. De asemenea, rezultate fals normale pot apărea la pacienţi cu hipertiroidism datorat unor tumori hipofizare secretante de TSH, care produc izoforme ale hormonului cu activitate biologică crescută.

Obţinerea unor rezultate discordante pentru TSH la pacienţi cu funcţie tiroidiană stabilă poate fi cauzată de diminuarea specificităţii unui test de laborator. Aceasta poate apărea în urma prezenţei unor agenţi care interferă cu testul (de ex., anticorpi heterofili) sau a unor izoforme anormale ale hormonului. În cazul unor rezultate neaşteptat de mari, se poate repeta testul după diluarea probei în ser, de preferat tireotoxic (care conţine, deci, un nivel foarte scăzut de TSH), pentru verificarea paralelismului. De asemenea, se poate repeta analiza utilizând o altă metodă (dacă nu este disponibilă o altă metodă, de la un alt producător, se va trimite proba pentru retestare la un alt laborator). Dacă variabilitatea între metode este mai mare de 50%, se poate suspiciona prezenţa unor substanţe interferente în probă.

Pentru investigarea biologică a unui rezultat neaşteptat de mare pentru TSH, se poate face un test de supresie la pacient. La administrarea p.o. a unei doze de 1 mg de L-T4 sau a 200 μg de L-T3, la indivizii normali se asteaptă o supresie cu minim 90% a nivelului de TSH în decursul următoarelor 48h.

În cazul unui rezultat scăzut pentru TSH se poate efectua printr-un test de stimulare cu TRH. Indivizii normali vor răspunde printr-o dublare a nivelului de TSH sau o creştere a TSH cu minim 4 mUI/L.

Sensibilitatea funcţională a testelor pentru TSH

Pentru determinarea sensibilităţii testelor pentru TSH, majoritatea producătorilor au renunţat la utilizarea parametrului de sensibilitate analitică, întrucât acesta este calculat din precizia determinărilor efectuate, în timpul aceleiaşi serii de lucru, asupra calibratorului zero, ceea ce nu reflectă sensibilitatea testului în practica clinică. A fost adoptat, în schimb, un alt parametru, sensibilitatea funcţională. Aceasta este calculată ca fiind 20% din coeficientul de variaţie between-run al metodei şi este utilizată pentru a stabili limita inferioară raportabilă a testului.

Protocolul după care este determinată sensibilitatea funcţională ţine cont de o multitudine de factori care influenţează, în practica clinică, precizia metodei de determinare a TSH. Acesştia includ: diferenţele de matrice dintre serul pacientului şi diluentul standard, contaminarea (*carry-over*) de la o probă cu concentraţie mare la una cu concentraţie mică a TSH, variabilitatea caracteristicilor reactivilor de la un lot la altul, diferenţele dintre calibrările instrumentului şi pe cele dintre operatori.

15.1.4 Hormonul adrenocorticotrop (ACTH)

15.1.4.1 Sinteza ACTH

Celulele corticotrope, care secretă ACTH, constituie aproximativ 20% din populaţia celulară a hipofizei. ACTH este un peptid format din 39 resturi de aminoacizi, provenit dintr-un precursor proteic, proopiomelanocortina (POMC). În afară de ACTH, POMC mai generează şi alte peptide biologic active, care au rolul de hormoni, precum lipotropina (LPH) şi hormonul melanocitostimulator (MSH), şi altele care acţionează ca neurotransmiţători sau neuromodulatori (endorfinele).

Gena POMC este exprimată în mai multe ţesuturi, printre care, celulele corticotrope hipofizare, neuronii POMC din nucleul arcuat al hipotalamusului, celule din derm, placenta, tractul gastrointestinal şi ţesutul limfoid. În toate aceste celule, POMC este procesată pentru producerea unor peptide mai mici, iar natura exactă a acestor peptide produse într-un ţesut depinde de tipul enzimelor prezente în acel ţeust capabile să proceseze prohormonul (*Figura 15.6*). Mai multe astfel de enzime au fost descrise până în prezent şi sunt cunoscute sub denumirea de *prohormon convertaze* (PC). PC sunt serin-proteaze capabile să efectueze proteoliza la nivelul a două resturi consecutive de aminoacizi bazici. Locusul de clivare cel mai frecvent observat este secvenţa Lys-Arg, dar PC pot acţiona şi la nivelul structurilor Lys-Lys, Arg-Arg şi Arg-Lys. Celulele corticotrope hipofizare exprimă PC1, dar nu şi PC2, ceea ce are ca rezultat scindarea POMC într-un peptid N-terminal, un peptid de legătură, ACTH, β-endorfină şi β-lipotropină. În hipotalamus însă, expresia PC2 conduce la formarea de α-, β- şi γ-MSH, fără producerea

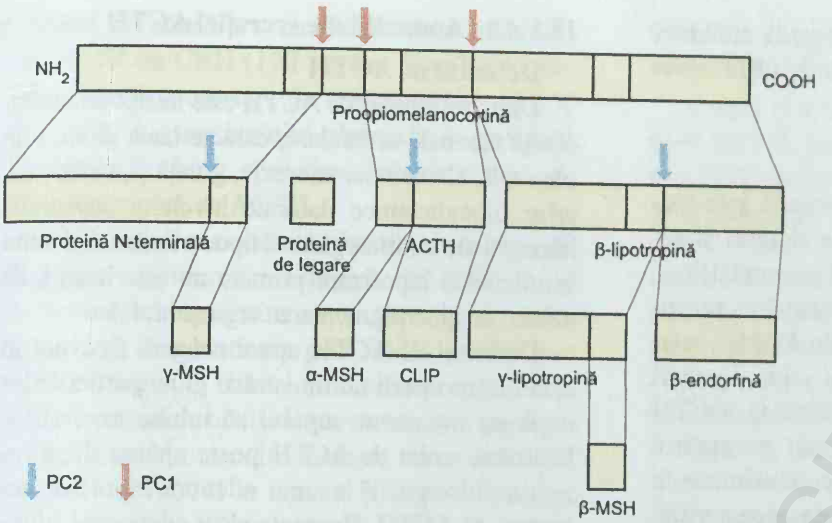


Figura 15.6. Procesarea enzimatică a proopiomelanocortinei

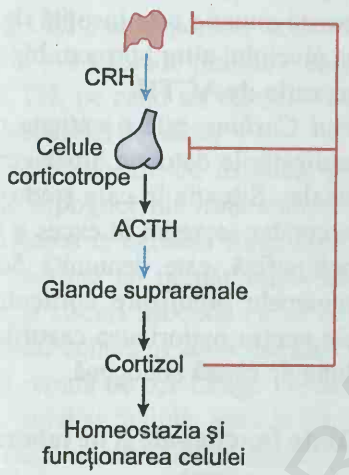


Figura 15.7. Mecanisme de feedback în reglarea secreţiei ACTH

de ACTH. Aceste peptide suferă modificări ulterioare ţesut-specifice care le influenţează activitatea: fosforilare, acetilare, glicozilare şi amidare.

15.1.4.2 Secreţia ACTH

Secreţia hipofizară de ACTH este influenţată de două sisteme reglatorii principale. Hipotalamusul are o acţiune stimulatoare peptidergică, mediată prin corticoliberină (CRH), care are o variaţie diurnă şi este foarte mult influenţată de stres. Nivelul de corticoizi circulanţi, în speţă cortizolul, controlează secreţia de ACTH printr-un mecanism de feedback negativ, acţionând atât la nivel hipofizar prin inhibiţia celulelor corticotrope, cât şi la nivel hipotalamic, inhibând neuronii secretori de CRH (*Figura 15.7*).

CRH este secretat în plexul capilar primar al sistemului port hipofizar, de la nivelul eminenţei hipotalamice mediane, apoi este transportat către hipofiza anterioară, unde induce secreţia ACTH.

Cortizolul şi analogii săi sintetici (de ex., prednisonul şi dexametazona) suprimă secreţia de ACTH. Astfel, în funcţie de glucocorticoidul utilizat, poate fi observat un răspuns care se instalează în decurs de câteva minute (feedback rapid) şi pare a fi mediat de receptori celulari de suprafaţă, urmat de o fază secundară, în care secreţia ACTH este diminuată timp de mai multe ore sau zile (feedback întârziat), această fază fiind mediată de receptori nucleari.

Vasopresina şi melatonina participă la controlul secreţiei ACTH, fiind implicate în stabilirea ritmului circadian al glucocorticoizilor. În plus, vasopresina eliberată la nivelul neurohipofizei, acţionează sinergic cu CRH pentru promovarea secreţiei ACTH din lobul anterior.

La om, concentraţia plasmatică a ACTH are un ritm circadian, cu un vârf la orele 6-8 dimineaţa şi un minim la miezul nopţii.

Atât stresul psihic, cât şi cel fizic, conduc la creşterea rapidă, în decursul câtorva minute, a secreţiei de ACTH şi de cortizol. stresul stimulează axul hipotalamo-hipofizo-suprarenalian (hipotalamo-pituitaro-adrenal, HPA), indiferent de concentraţia glucocorticoizilor circulanţi. Dacă stresul persistă, neuronii parvocelulari hipotalamici secretă CRH cu o frecvenţă ridicată, mutând punctul de echilibru al axei de control la un nivel mai ridicat.

Agresiuni inflamatorii sau septice asupra organismului activează axul HPA prin acţiunea concertată a citokinelor proinflamatorii, a semnalelor neuronale şi a toxinelor bacteriene. Citokinele care induc secreţia de ACTH includ factorul de necroză tumorală (TNF), IL-1, 2 şi 6. Acestea activează secreţia hipotalamică de CRH şi vasopresină, expresia genei POMC la nivel hipofizar şi reţele paracrine de citokine hipofizare. Acest mecanism de feedback conduce la creşterea nivelului cortizolului circulant, care limitează răspunsul inflamator şi asigură protecţia gazdei. În acelaşi timp, acţiunea glucocorticoizilor asupra receptorilor specifici hipofizari este dimi-

nuată prin semnalizarea mediată prin citokine, împiedicând supresia axului HPA de către nivelele crescute de cortizol.

15.1.4.3 Acţiune/ efecte

ACTH produs în hipofiza anterioară este factorul fiziologic major de reglare a sintezei şi secreţiei glucocorticoizilor la nivelul suprarelalelor.

Receptorul pentru ACTH, împreună cu receptorii celorlalte peptide derivate din POMC, aparţine marii familii de receptori cu şapte domenii transmembranare cuplaţi cu proteine G. ACTH se fixează pe receptorul său, denumit „receptorul 2 pentru melanocortină" (MC2), cu o afinitate în domeniul nanomolar. Interacţiunea receptorului cu ligandul are ca rezultat activarea adenilat ciclazei via G_{as}, cu creşterea nivelului intracelular de AMPc. Urmează etapa cea mai importantă dintre toate fenomenele controlate de ACTH în procesul de secreţie a corticosuprarenalei, şi anume activarea protein kinazei A. Aceasta, prin fosforilarea mai multor proteine, conduce la conversia iniţială a colesterolului în pregnenolonă, etapa limitantă de viteză pentru sinteza tuturor hormonilor corticosuprarenali. După stimularea cu ACTH, secreţia cortizolului de către celulele competente apare rapid, într-un interval de timp de ordinul secundelor sau minutelor. Stimularea îndelungată a corticosuprarenalei de către ACTH produce hipertrofia şi proliferarea celulelor prezente în zona fasciculată şi zona reticulară, sediile de secreţie a cortizolului şi androgenilor.

La mamifere, glanda hipofiză are în structura sa un lob intermediar, care la om este dezvoltat în viaţa intrauterină şi se găseşte în formă vestigială la adult. Acest lob conţine celule melanotrope, care produc POMC şi îl procesează pentru obţinerea în cantitate mare a α-MSH şi CLIP (peptidul similar corticotropinei, provenit din lobul intermediar) din ACTH. MSH are rolul de a stimula melanocitele să sintetizeze melanină şi să determine pigmentarea dermului. La om, producerea de MSH este mult mai mică decât la alte mamifere, dar ACTH este secretat în cantităţi importante. Deoarece ACTH conţine o secvenţă tetrapeptidică His-Phe-Arg-Trp comună cu MSH, cu rol în recunoaşterea de către receptorii pentru ACTH şi melanocortină, este posibil ca ACTH să joace un rol important în pigmentarea tegumentului la om, în special în sindroamele de hipersecreţie de ACTH.

15.1.4.4 Anomalii ale secreţiei ACTH

Deficitul de ACTH

Deficitul primar de ACTH este însoţit de insuficienţă adrenală secundară, caracterizată clinic prin oboseală, slăbiciune, anorexie, greaţă şi, ocazional, crize hipoglicemice datorate hivelului scăzut de hormoni de contrareglare. Hipocorticismul datorat insuficienţei hipofizare primare nu este însoţit, de obicei, de hiperpigmentarea tegumentului.

Deficitul de ACTH apare cel mai frecvent în cazul întreruperii administrării glucocorticoizilor după un tratament capabil să inhibe axul HPA. Deficitul izolat de ACTH poate apărea după rezecţia chirurgicală a unui adenom hipofizar secretant de ACTH. Prezenţa altor adenoame hipofizare, prin efectul compresiv, poate determina diminuarea producerii de ACTH la nivel hipofizar, dar această situaţie este însoţită de obicei şi de scăderea nivelului altor hormoni hipofizari.

Hipersecreţia de ACTH

Sindromul Cushing este o entitate clinică ce include manifestările datorate hipersecreţiei corticosuprarenalei. Situaţia în care sindromul Cushing este secundar secreţiei în exces a ACTH de către adenohipofiză, este denumită *boală Cushing*. Adenoamele hipofizare corticotrope sunt responsabile pentru majoritatea cazurilor de sindrom Cushing de cauză endogenă.

15.1.4.5 Teste funcţionale şi de laborator

Determinarea ACTH este un marker important în *diagnosticul diferenţial al sindromului Cushing* şi evaluarea cauzei hipercorticismului endogen: tumoră hipofizară, secreţie ectopică de ACTH sau adenom/ carcinom secretant suprarenal. Nivele nedetectabile atât bazal, cât, mai ales, după stimularea cu CRH, sugerează o cauză primară adrenală. Nivele crescute sugerează o cauză hipofizară. Dacă ACTH este detectabil, diverse teste funcţionale pot fi utilizate pentru diferenţierea bolii Cushing de secreţia ectopică de ACTH, care este mai rară:

- ***Testul de supresie cu dexametazonă:*** după administrarea de dexametazonă în doză mare (2 mg oral, la fiecare 6 ore, timp de 48 ore), nivelul seric al cortizolului evaluat din probe recoltate dimineaţa, la ora 9, scade cu > 50% la majoritatea pacienţilor cu boală Cushing; cei mai mulţi pacienţi cu secreţie ectopică de ACTH nu răspund la testul de supresie.

- ***Testul de stimulare cu CRH:*** după administrarea IV de CRH (100 μg sau 1 μg/kgc), este înregistrată o creştere de aprox. 50% a ACTH şi de 20 % a cortizolului plasmatic la pacienţii cu boală Cushing, spre deosebire de cei cu secreţie ectopică de ACTH .

O procedură mai exactă, dar mai invazivă, de diferenţiere a secreţiei ectopice de ACTH şi a adenoamelor hipofizare secretante prea mici pentru a fi diagnosticate prin RMN şi care pot avea caracteristici clinice şi biochimice similare, este cateterizarea bilaterală a sinusurilor pietroase inferioare. În condiţii bazale, raportul dintre concentraţia ACTH în sinusul pietros inferior şi cea în sângele periferic este > 2 în cazul adenoamelor secretante hipofizare şi < 2 în cazul secreţiei ectopice de ACTH. La 5 minute după stimularea cu CRH, un raport de concentraţii central:periferic > 3 exclude practic o secreţie ectopică de ACTH, pe când un raport < 3 sugerează prezenţa unei astfel de surse.

Testul de provocare cu insulină, prin stresul provocat de hipoglicemie, este standardul de aur pentru evaluarea integrităţii funcţionale a axului HPA, dar prezintă un număr important de contraindicaţii şi riscuri asociate (*v. şi subcapitolul 15.1.1*). Testul constă în administrarea unei doze de insulină rapidă de 0,1 U/kgc IV, în decurs de 15-30 sec. Imediat înainte, apoi la 20, 30 45, 60 şi 90 min după administrarea insulinei, se prelevă eşantioane de sânge pentru determinarea glicemiei şi cortizolemiei. În cazul unui test valid, definit prin scăderea glicemiei sub 40 mg/dL (< 2,22 mmol/L) sau prin apariţia simptomelor de hipoglicemie, cortizolemia trebuie să crească, la un individ normal, cu minim 7 μg/dL sau până la valori > 20 μg/dL.

Testul cu CRH poate fi utilizat pentru *diferenţierea între cauzele hipotalamice şi hipofizare de deficit de ACTH*, dar este rar întâlnit în practica clinică. După administrarea IV a 100 μg (sau 1 μg/kgc) de CRH, răspunsul normal este reprezentat de o creştere a ACTH plasmatic de 30-40 pg/mL. Pentru acest test, eşantioanele de sânge sunt recoltate la 15 min. înainte de administrarea CRH, apoi la 15, 30, 60, 90 şi 120 min după administrare. Pacienţii cu insuficienţă hipofizară nu răspund la acest test, spre doesebire de aceia cu afecţiune hipotalamică.

15.1.4.6 Aspecte particulare ale determinării concentraţiei ACTH circulante

Pentru recoltarea sângelui în scopul determinării ACTH, pacientul trebuie să stea aşezat, într-o încăpere liniştită. Dacă nu se reuşeşte recoltarea sângelui de la prima încercare, rezultatele obţinute dintr-o probă de sânge obţinută imediat ulterior nu sunt valide. La pacienţii anxioşi, concentraţia ACTH poate creşte de până la dublul limitei normale superioare. De aceea, se recomandă amplasarea unei canule intravenoase şi recoltarea sângelui 30 minute mai târziu.

Datorită ritmului circadian al secreţiei ACTH şi cortizolului, pentru interpretare este necesară cunoaşterea orei de recoltare a sângelui.

ACTH este un analit „fragil". Sângele se recoltează în tuburi heparinate răcite în prealabil. Se recomandă separarea plasmei utilizând o centrifugă cu refrigerare, în decurs de 10 minute de la puncţia venoasă. Plasma obţinută este congelată şi se transportă îngheţată la laborator. Se recomandă, de asemenea, obţinerea unei probe „de rezervă", care poate fi utilizată în cazul în care prima probă se dezgheaţă în timpul transportului sau dacă testul de laborator eşuează.

Probele hemolizate nu sunt potrivite pentru determinarea ACTH, deoarece rezultatele obţinute sunt fals scăzute.

Dacă proba de plasmă ajunge dezghţată în laborator, se aruncă. Probe parţial dezgheţate pot fi acceptate, cu condiţia să fie congelate imediat în laborator. Probele care ajung la laborator îngheţate pot fi păstrate congelate timp de minim 6 luni.

Toate recipientele utilizate pentru recoltarea şi stocarea probelor de sânge destinate testării ACTH trebuie să fie din material plastic şi nu din sticlă, deoarece ACTH este adsorbit pe suprafeţele de sticlă.

Pentru creşterea performanţelor analitice ale testelor de laborator, se poate utiliza o procedură de extracţie a ACTH din probă cu particule de sticlă, urmată de spălare şi eluţie în acetonă. Acetona este lăsată apoi să se evapore, iar reziduul uscat este redizolvat într-un tampon pentru testare.

În scopul îmbunătăţirii specificităţii şi depăşirii unora dintre dezavantajele primelor generaţii de teste radioimune, testele moderne pentru ACTH şi peptidele înrudite utilizează adesea un format imunometric cu doi anticorpi monoclonali direcţionaţi faţă de doi epitopi diferiţi de pe molecula analitului. Există, totuşi, un dezavantaj al

acestor teste: specificitatea extremă, nepotrivită pentru anumite situaţii clinice. Ele nu vor putea determina decât moleculele care conţin ambii epitopi, iar fragmentele bioactive produse de unele tumori secretante de ACTH nu vor fi detectate.

15.1.5 Hormonii gonadotropi (FSH şi LH)

15.1.5.1 Sinteza şi secreţia hormonilor gonadotropi

Celulele gonadotrope reprezintă aproximativ 10% din populaţia celulară a hipofizei anterioare şi produc doi hormoni gonadotropi: hormonul foliculostimulator (FSH) şi hormonul luteinizant (LH). LH şi FSH, la fel ca şi TSH şi hCG, au structură glicoproteică. Fiecare dintre aceşti patru hormoni este alcătuit din două subunităţi legate necovalent: o subunitate α, identică la toţi membrii familiei, şi o subunitate β unică (LHβ, FSHβ, hCGβ şi TSHβ), care îi conferă specificitate biochimică şi biologică. Subunităţile α şi β sunt codate de gene separate aflate pe cromozomi diferiţi.

La adult, secreţia LH este ritmică. Ritmul secreţiei este relativ constant la bărbaţi, cu un puls secretor aproximativ la fiecare 90 min. La femei însă, ritmul secretor variază atât ca frecvenţă, cât şi ca amplitudine, în timpul ciclului ovarian. În general, secreţia de LH are intensitate mai mică în prima parte a ciclului, dar creşte odată cu dezvoltarea foliculului ovarian şi cu creşterea nivelelor de estrogeni şi progesteron, culminând cu o „descărcare" de LH la mijlocul ciclului ovarian. Această descărcare a unei cantităţi importante de LH este esenţială pentru ovulaţie. După ovulaţie, *corpus luteum* sintetizează progesteron şi estrogeni, iar nivelul de LH circulant este diminuat.

15.1.5.2 Reglarea secreţiei hormonilor gonadotropi

Sinteza FSH este reglată în principal la nivelul transcripţiei subunităţii β, care este subunitatea limitantă pentru producerea FSH în celulele gonadotrope hipofizare.

Gonadoliberina (GnRH) secretată de hipotalamus este un inductor major al expresiei FSHβ. GnRH este un peptid alcătuit din 10 resturi de aminoacizi, care reglează sinteza şi secreţia FSH şi LH. GnRH este secretat periodic în circulaţia portală hipotalamo-hipofizară. Stimularea secreţiei LH şi FSH este dependentă de frecvenţa pulsurilor GnRH: frecvenţe mai ridicate (descărcări la interval de 30-90 min) favorizează în general LH, iar frecvenţe mai scăzute (descărcări la intervale mai mari de 120 min) favorizează FSH. Secreţia pulsatilă a GnRH este esenţială pentru acţiunea sa: pulsurile secretorii stimulează responsivitatea celulelor gonadotrope, pe când expunerea continuă la GnRH induce desensibilizare. În absenţa secreţiei hipotalamice de GnRH, celulele gonadotrope hipofizare nu secretă LH şi FSH aproape deloc.

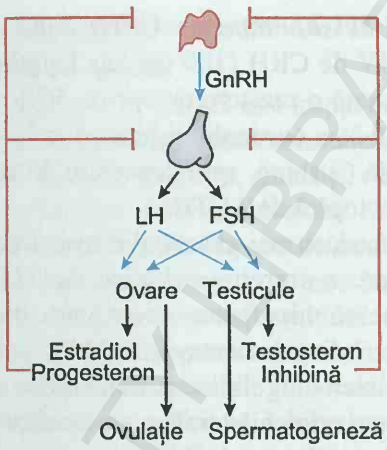


Figura 15.8. Reglarea prin feedback a secreţiei hormonilor gonadotropi

Hormonii steroizi pot avea o acţiune reglatoare asupra LH atât la nivel hipotalamic, alterând frecvenţa pulsurilor GnRH, cât şi la nivel pituitar, modulând fie direct sinteza LH, fie răspunsul glandei la acţiunea GnRH (*Figura 15.8*). La bărbaţi, feedback-ul exercitat de steroizi este de obicei negativ, pe când la femei a fost descris atât un feedback pozitiv, înainte de descărcarea de LH, cât şi unul negativ, în restul ciclului ovarian.

Estrogenii controlează secreţia de hormoni gonadotropi, acţionând atât la nivel hipotalamic, cât şi la nivel hipofizar. Expunerea cronică la estrogeni are efect inhibitor, pe când creşterea continuă a nivelelor de estrogeni, precum cea dinaintea ovulaţiei, exercită un feedback pozitiv, care determină creşterea frecvenţei şi amplitudinii pulsurilor de gonadotropi. Progesteronul diminuează frecvenţa pulsurilor de GnRH, dar accentuează răspunsul hormonilor gonadotropi la GnRH. Nivelele serice de FSH şi LH sunt mai mari la femeile la menopauză, comparativ cu cele aflate la vârsta fertilă, datorită diminuării funcţiei ovariene.

La bărbat, testosteronul exercită şi el un feedback la nivel hipotalamic şi hipofizar, care reflectă conversia sa parţială în estrogeni.

Sinteza FSH este, de asemenea, controlată prin intermediul peptidelor gonadice *inhibina* şi *activina*, doi membri ai familiei factorului de creştere şi transformare beta (TGF-β). Inhibina este un supresor selectiv, iar activina este un stimulator al sintezei de FSH.

Atunci când producerea de spermatozoizi la nivelul tubilor seminiferi nu este suficientă, secreţia de FSH creşte marcat. Invers, când spermatogeneza se desfăşoară prea rapid, secreţia de FSH diminuează. Acest feedback negativ este realizat prin intermediul inhibinei sintetizate la de către celulele Sertoli si este un mecanism important de control al spermatogenezei. La femei, celulele corpului galben sunt cele care secretă inhibina. Aceasta, alături de estrogeni, acţionează la nivel hipofizar, rezultând diminuarea secreţiei FSH şi LH. În cele din urmă, nivelul scăzut de hormoni gonadotropi determină degenerarea completă a corpului galben.

15.1.5.3 Acţiunea hormonilor gonadotropi

Acţiunea LH

LH acţionează asupra celulelor prin intermediul unui receptor cu şapte domenii transmembranare cuplat cu o proteină Gs. Activitatea sa biologică este dependentă de activarea adenilat ciclazei de către proteina Gs, urmată de creşterea AMPc intracelular, care activează, la rândul său, protein kinaza A şi, în consecinţă, alte enzime intracelulare.

LH joacă un rol important în funcţia endocrină a testiculelor, acţionând la nivelul celulelor Leydig pentru a promova sinteza de testosteron necesar pentru producţia normală de spermatozoizi şi pentru fertilitate.

LH este necesar pentru desfăşurarea ultimelor faze ale creşterii foliculare şi pentru ovulaţie. Numărul mare de receptori pentru LH de la nivelul foliculului matur îl fac sensibil la LH, iar descărcarea masivă de LH induce ruptura foliculului şi ovulaţia. În absenţa acestui hormon, chiar dacă FSH este disponibil în cantităţi mari, foliculul ovarian nu evoluează până la stadiul de ovulaţie. Cu aproximativ două zile înaintea ovulaţiei, rata secreţiei de LH se intensifică marcat, crescând de 6-10 ori şi atingând un vârf cu 16 ore înainte de ovulaţie. Nivelul FSH, la rândul său, creşte de 2-3 ori şi ambii hormoni gonadotropi acţionează sinergic pentru a stimula creşterea foliculului înaintea ovulaţiei. LH are şi un efect specific asupra celulelor granuloasei şi asupra celor tecale, convertindu-le în celule secretante de progesteron. Prin urmare, rata secreţiei de estrogeni diminuează începând cu prima zi după ovulaţie, în timp ce cantităţi crescânde de progesteron încep să fie secretate.

Acţiunea FSH

FSH acţionează prin ataşarea la receptorul său specific, un receptor clasic cu şapte domenii transmembranare cuplat cu proteine G, care se găseşte numai la nivelul celulelor granuloasei sau al celulelor Sertoli.

Pentru iniţierea spermatogenezei, sunt necesari atât testosteronul, cât şi FSH. FSH stimulează celulele Sertoli să hrănească spermatogeniile pe măsură ce acestea se maturizează în spermatocite. În absenţa stimulării celulelor Sertoli de către FSH, apare o reducere a fertilităţii masculine, fără să fie afectat testosteronul sau caracterele sexuale secundare. În acest caz, bărbatul poate să apară viril, dar să producă un număr foarte scăzut de spermatozoizi.

La femei, celulele granuloasei sunt similare celulelor Sertoli de la bărbaţi. Acestea reprezintă singurul tip de celule din organismul feminin care posedă receptori pentru FSH, iar funcţia lor este aceea de nutriţie a ovocitului din interiorul foliculului ovarian. Deoarece celulele granuloasei produc, de asemenea, şi estrogeni care induc apariţia caracterelor sexuale secundare feminine şi menţinerea ciclului menstrual, insuficienţa FSH la femei nu cauzează doar infertilitate, ci este evidentă şi din punct de vedere clinic.

În timpul fazei foliculare, există o perioadă importantă de creştere a nivelului FSH, care influenţează dezvoltarea foliculară. Această creştere este considerată a fi singura creştere a FSH cu importanţă fiziologică din timpul ciclului reproductiv. Diminuarea nivelului FSH din restul fazei foliculare joacă un rol important în selectarea unui singur folicul dominant care va evolua până la ovulaţie. După ce atinge dimensiunea de aproximatic 10 mm, foliculul dominant devine independent de stimularea de către gonadotropi şi îşi continuă creşterea chiar şi în timpul declinului FSH din ultima parte a fazei foliculare. Acest folicul dominant secretă estrogenii necesari declanşării descărcării de gonadotropi care va determina ruperea foliculului matur şi ovulaţia. Numai foliculul cel mai matur devine independent de producţia de gonadotropi, în timp ce restul (99,9% din foliculi) îşi opresc evoluţia în moment ce FSH scade sub un anumit nivel-prag necesar pentru menţinerea lor şi suferă un proces de atrezie.

FSH este utilizat pentru a induce dezvoltarea foliculului ovarian la femeile cu amenoree de cauză hipotalamică (nivel scăzut de gonadotropi), infertilitate de cauză necunoscută sau endometrioză. Acestor femei li se administrează FSH pentru a induce ovulaţia. Dacă este necesară fertilizarea *in vitro*, dozele de FSH administrate sunt foarte mari, pentru a satura receptorii de la nivelul celulelor granuloasei. Aceasta permite mai multor foliculi să atingă faza preovulatorie. Ovocitele acestor foliculi sunt prelevate înaintea momentului normal al ovulaţiei şi sunt fertilizate *in vitro*. În acest fel, numărul de embrioni transferaţi înapoi în uter este controlat, iar embrionii în surplus sunt crioconservaţi pentru o eventuală utilizare ulterioară.

15.1.5.4 Anomaliile secreţiei hormonilor gonadotropi

Deficitul de hormoni gonadotropi

Hipogonadismul este manifestarea cea mai frecvent întâlnită în cazul hipopituitarismului la adult. Adesea, hipogonadismul este o manifestare precoce a afecţiunilor hipotalamice sau hipofizare care afectează producţia gonadoliberinei sau transportul acesteia prin tija hipofizară.

La femeile aflate la vârsta fertilă, hipogonadismul hipogonadotrop se manifestă ca o diminuare a funcţiei ovariene asociată cu oligomenoree sau amenoree, infertilitate, diminuarea cantitativă a secreţiilor vaginale, scăderea libidoului şi atrofie mamară. La bărbaţii cu hipogonadism, insuficienţa testiculară secundară este asociată cu diminuarea libidoului, tulburări ale erecţiei, infertilitate, scăderea masei şi forţei musculare, a pilozităţii faciale şi corporale, testicule de consistenţă moale şi apariţia unor riduri faciale fine, caracteristice. Atât la femeile, cât şi la bărbaţii care nu primesc tratament, se poate instala osteoporoza.

În prezent, nu se cunosc deleţii ale genelor pentru subunitatea β a LH sau pentru receptorul LH la om. Totuşi, există mai multe mutaţii inactivatoare ale acestor gene, care, prin pierderea funcţionalităţii LH, determină hipoplazia celulelor Leydig, absenţa sau producerea în cantităţi foarte scăzute a testosteronului, absenţa apariţiei caracterelor sexuale secundare şi infertilitate.

Hipersecreţia / hiperfuncţia hormonilor gonadotropi

În timp ce majoritatea adenoamelor hipofizare nefuncţionale provin din celulele gonadotrope, adenoamele hipofizare clinic funcţionale secretante de hormoni gonadotropi sunt extrem de rare. Acestea produc atât cantităţi mici de hormoni intacţi (de obicei FSH), cât şi subunităţi libere α şi β de LH şi FSH.

La bărbaţi, adenoamele secretante de gonadotropi se pot manifesta prin nivele ridicate de testosteron, în prezenţa unor valori „normale" sau crescute ale FSH şi LH. Foarte rar, la femei, prezenţa acestor adenoame poate determina apariţia unui sindrom de hiperstimulare ovariană. Cel mai adesea însă, datorită compresiei exercitate la nivelul tijei hipofizare, nivelul prolactinei este uşor crescut, iar situaţia clinică rezultată poate mima insuficienţa ovariană primară, cu amenoree şi hormoni gonadotropi crescuţi.

15.1.5.5 Investigaţii de laborator

Determinarea LH seric este utilizată pentru:

- evaluarea infertilităţii, atât la bărbaţi, cât şi la femei (valori serice crescute ale LH sunt asociate adesea cu disfuncţie gonadică, iar valori scăzute sunt asociate cu disfuncţia sau insuficienţa hipotalamică sau hipofizară);
- evaluarea terapiei hormonale de inducere a ovulaţiei;
- evaluarea endocrinologică a pubertăţii precoce.

În diagnosticul adenoamelor hipofizare secretante de gonadotropi, evaluarea nivelelor FSH şi LH are o mică utilitate. În majoritatea cazurilor, administrarea TRH stimulează secreţia subunităţii β a LH, răspuns neîntâlnit la indivizii normali. Determinarea nivelelor GnRH nu este nici ea utilă în punerea diagnosticului.

Testul de stimulare cu GnRH

Administrarea intravenoasă a GnRH (100 μg) stimulează celulele gonadotrope să secrete LH, care atinge un maxim de concentraţie serică după 30 min, şi FSH, care atinge un platou în următoarele 60 min. La femei, răspunsul normal la această stimulare variază în funcţie de stadiul ciclului menstrual şi de vârstă. În general, nivelul LH creşte de aproximativ 3 ori, în timp ce răspunsul FSH este mai puţin pronunţat. În cazul deficitului de gonadotropi, un răspuns normal al FSH şi LH la stimularea cu GnRH sugerează o leziune hipotalamică. Lipsa răspunsului la stimulare însă nu poate deosebi cauzele hipofizare de cele hipotalamice de hipogonadism. Din această cauză, cu excepţia cazurilor izolate de deficit izolat de GnRH, precum cel întâlnit în sindromul Kallmann, testul de stimulare cu GnRH aduce puţine informaţii suplimentare faţă de evaluarea de bază a axului hipotalamo-hipofizo-gonadotrop.

Testul cu clomifen

Este utilizat pentru diferenţierea deficitului de hormoni gonadotropi de alte cauze de amenoree de origine hipotalamică. În urma administrării de clomifen în doză de 3 mg/kgc, maxim 200 mg, timp de 7 zile consecutive, la pacienţii cu deficit de gonadotropi de cauză organică nu se observă nici o creştere a nivelelor de FSH şi LH măsurate în zilele 0, 4, 7 şi 10, pe când unii pacienţi cu amenoree de cază hipotalamică sau cu pubertate întârziată răspund printr-o creştere a nivelelor de hormoni gonadotropi , urmată adesea de menstruaţie după 28 zile, în cazul pacienţilor de sex feminin.

15.1.5.6 Aspecte particulare ale investigării de laborator a funcţiei hormonilor gonadotropi

Pentru determinarea concentraţiei serice a FSH şi LH există multiple formate de teste. Cele automate sunt non-radioactive, majoritatea având la bază teste imunometrice şi de chemiluminiscenţă. Există, de asemenea, şi teste care pot fi efectuate manual, care utilizează o gamă mai largă de metode de detecţie: radioactivă, enzimatică, prin fluorescenţă sau chemiluminiscenţă.

Indiferent de formatul testului utilizat, informaţiile din faza preanalitică sunt esenţiale. Pentru femei, este important să fie precizată, pe buletinul de cerere de analize, data ultimului ciclu menstrual. Dacă pacienta se află în perioada menopauzei, trebuie notată vârsta acesteia.

Pentru a minimiza erorile de măsurare datorate secreţiei pulsatile a hormonilor gonadotropi, se pot amesteca probele de ser obţinute în urma recoltării a trei probe de sânge la intervale de 20 min. Teste pentru LH efectuate din urina colectată de-a lungul a 24 ore sunt utilizate pentru monitorizarea ciclurilor ovulatorii la femeile care apelează la tehnica de fertilizare *in vitro*.

Deoarece LH şi hCG au structuri asemănătoare, testele imunometrice pentru LH care utilizau anticorpi policlonali aveau o reactivitate încrucişată substanţială cu hCG. În cazul utilizării testelor imunometrice bazate pe anticorpi monoclonali, reactivitatea încrucişată cu peptide similare analitului este foarte mică. Totuşi, trebuie acordată atenţie prezenţei unei reacţii încrucişate între testul pentru LH şi hCG prezent în proba biologică, chiar dacă aceasta are o amplitudine aparent mică. Spre exemplu, la un test, reacţia încrucişată poate duce la un rezultat de 5 UI/L pentru LH într-o probă de ser de la o pacientă însărcinată în 2-4 săptămâni, cu un nivel al hCG de 20 000 UI/L. Reactivitatea încrucişată este, în acest caz, de 0,025%. În cazul aceleiaşi persoane, la vârsta sarcinii de 8 săptămâni, nivelul hCG circulant ajunge la 200 000 UI/L, ducând la o creştere de 10 ori a rezultatului pentru LH obţinut prin testul respectiv. Astfel, aceste rezultate pot crea confuzie în cazul necunoaşterii existenţei reactivităţii încrucişate între cei 2 analiţi.

Ca şi alte teste care utilizează anticorpi monoclonali, testele imune pentru dozarea FSH şi LH pot fi influenţate de prezenţa anticorpilor heterofili în sângele pacientului.

În activitatea de cercetare efectuată pe animale, de exemplu pe rozătoare, trebuie ţinut cont de faptul că, spre deosebire de testele destinate altor analiţi, kiturile de laborator pentru determinarea FSH şi LH la om nu pot fi utilizate pentru determinări pe eşantioane de ser obţinute de la alte vertebrate, deoarece erorile de determinare sunt semnificative.

15.2 Hipofiza posterioară

Lobul posterior al glandei hipofize, denumit şi *neurohipofiza*, este alcătuit în principal din *pituicite*, celule asemănătoare celulelor gliale. Pituicitele nu secretă hormoni, ci servesc doar ca suport pentru numeroasele terminaţii nervoase ale tracturilor nervoase ce îşi au originea în nucleii hipotalamici supraoptic, respectiv paraventricular. Pentru a ajunge la nivelul neurohipofizei, aceste tracturi străbat tija hipofizară (*Figura 15.9*). Terminaţiile nervoase conţin granule secretorii şi se găsesc la suprafaţa capilarelor, unde eliberează cei doi hormoni neurohipofizari: *hormonul antidiuretic* (ADH), denumit şi *vasopresină*, respectiv *oxitocina*.

În cazul secţionării tijei hipofizare, hormonii neurohipofizei continuă să fie secretaţi, cu condiţia ca nucleii hipotalamici care îi sintetizează să rămână intacţi. În acest caz, chiar dacă cei doi hormoni nu mai ajung să fie secretaţi la nivelul hipofizei posterioare, ei sunt eliberaţi de la nivelul terminaţiilor nervoase secţionate.

Structura şi secreţia hormonilor neurohipofizari

Ambii hormoni sunt nonapeptide, cu o legătură disulfidică între resturile de cisteină din poziţiile 1 şi 6 care determină formarea unui inel de 6 aminoacizi şi a unei catene laterale de 3 resturi de aminoacizi. Moleculele celor doi hormoni nu

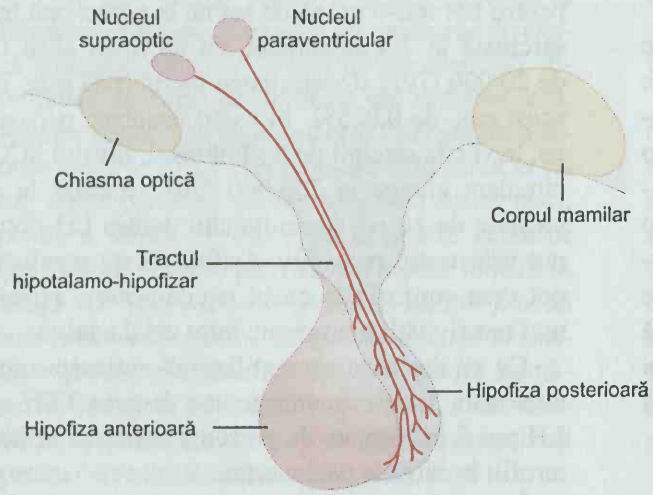


Figura 15.9. Hormonii retrohipofizari sunt sintetizaţi la nivelul hipotalamusului

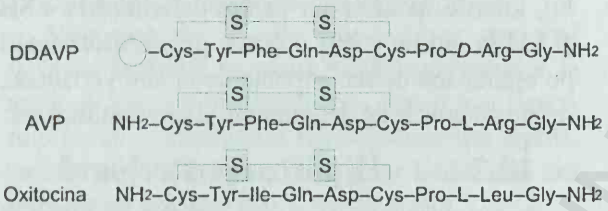


Figura 15.10. Structurile DDAVP, ADH şi oxitocinei

diferă decât prin 2 aminoacizi (*Figura 15.10*). Având în vedere similitudinile structurale şi de organizare ale genelor celor doi hormoni, precum şi procesarea posttranslaţională identică, este aproape sigur faptul că ADH şi oxitocina au evoluat dintr-o singură genă ancestrală. Genele care îi codifică ocupă locusuri adiacente pe cromozomul 20, dar prezintă orientare transcripţională opusă (*Figura 15.11*).

După transferul lor la nivelul aparatului Golgi, prohormonii ADH şi oxitocinei sunt incluşi în vezicule secretorii, împreună cu enzimele capabile să îi cliveze la produşii finali. Veziculele secretorii sunt transportate apoi, de-a lungul axonilor, până la nivelul terminaţiilor nervoase de la nivelul neurohipofizei, unde sunt depozitate. Vasopresina şi oxitocina sunt stocate sub formă de complexe, în raport echimolar cu nişte peptide de 93-95 aminoacizi, denumite *neurofizine*. Neurofizinele sunt, de fapt, segmente adiacente secvenţelor hormonilor activi, la nivelul moleculelor de prohormoni. Acestea sunt cosecretate cu ADH şi cu oxitocina, dar funcţia lor hormonală nu este cunoscută. Datorită pH-ului acid de la nivelul granulelor, ADH şi oxitocina sunt strâns legaţi de neurofizinele lor.

Sursa principală de vasopresină este reprezentată de celulele nucleului supraoptic al hipotalamusului, în timp ce oxitocina este sintetizată în special de către celulele nucleului paraventricular. Întrucât ambii hormoni sunt sintetizaţi şi stocaţi în celule nervoase, este de aşteptat ca şi secreţia lor să fie controlată în mod similar cu cea a neurotransmiţătorilor „clasici". Într-adevăr, potenţiale de acţiune generate la nivelul hipotalamusului se pot propaga de-a lungul axonilor, prin tija hipofizară şi să declanşeze un influx de calciu la nivelul terminaţiilor nervoase, urmat de eliberarea conţinutului veziculelor secretorii. Odată ajunşi în mediul extracelular, datorită pH-ului mai ridicat de la acest nivel, hormonii disociază de neurofizinele corespunzătoare şi, astfel, ajung în circulaţie în formă liberă. Vasopresina şi oxitocina sunt rapid înlăturate

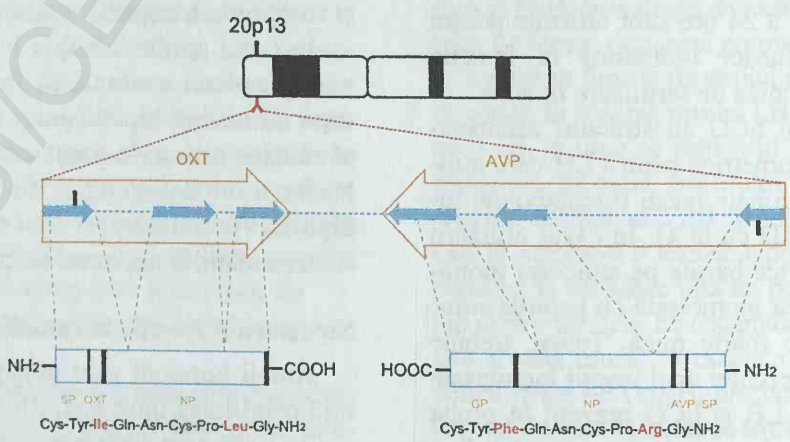


Figura 15.11. Vasopresina şi oxitocina: reprezentarea schematică a genelor, prohormonilor şi peptidelor
SP = peptid semnal, NP = neurofizină, GP = glicopeptid, OXT = oxitocină, AVP = vasopresina

BCU IASI CENTRU UNIVERSITAR

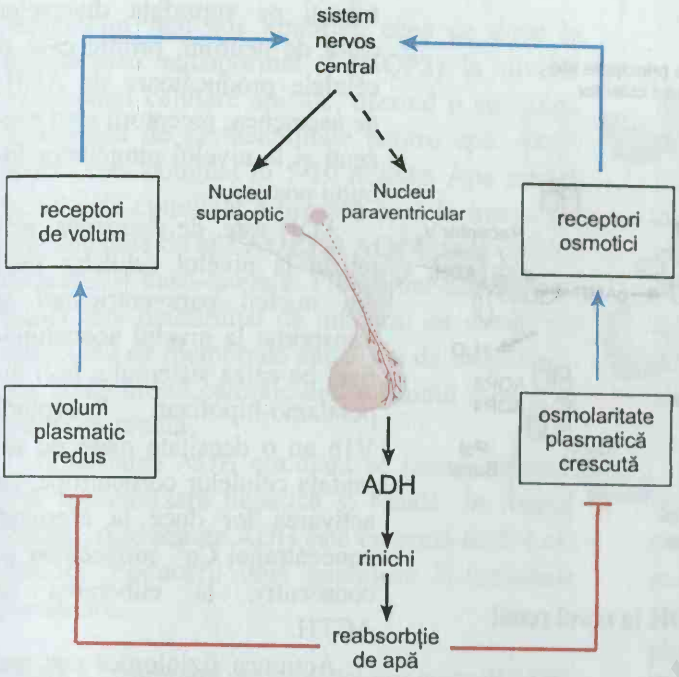


Figura 15.12. Reglarea secreţiei hormonului antidiuretic

din torentul sanguin, având un timp de înjumătăţire de câteva minute.

15.2.1 Hormonul antidiuretic (ADH)

Deoarece hormonul uman are în poziţia 8 a moleculei, un rest de arginină în loc de lizina identificată în molecula de hormon izolată iniţial de la porc, hormonul antidiuretic uman mai este denumit şi *arginin vasopresină.*

15.2.1.1 Reglarea secreţiei ADH

Osmolalitatea plasmatică crescută, scăderea volemiei şi hipotensiunea sunt stimulii cei mai eficienţi, dar şi cei mai intens studiaţi, pentru eliberarea ADH (*Figura 15.12*).

Secreţia ADH este reglată în primul rând de către prosiunea osmotică „efectivă" a fluidelor organismului. Acest control este mediat de celule hipotalamice specializate, osmoreceptorii, care sunt extrem de sensibili la modificări mici ale concentraţiei sodiului şi a altor constituienţi plasmatici, dar sunt insensibili la variaţiile concentraţiei glucozei sau ureei. Activitatea osmoreceptorilor are o componentă inhibitorie şi una stimulatoare care se manifestă simultan, impunând un anumit prag în controlul secreţiei de ADH. Sub acest prag, secreţia ADH este suprimată, astfel încât se obţine o diureză maximă. Deasupra acestui prag, secreţia ADH creşte puternic, proporţional cu osmolaritatea plasmatică, ajungând rapid la nivele care determină un efect antidiuretic maxim (*v. capitolul 2.5.2*). Pragul mediu pentru declanşarea secreţiei ADH este o osmolaritate de aproximativ 280 mosmol/L sau o natremie de 135 mEq/L, în timp ce valori cu doar câteva procente mai mari ale acestor parametri determină o antidiureză maximă. Acest prag al sistemului osmoreglator este relativ stabil la adultul sănătos, dar poate fi diminuat în sarcină sau în cursul ciclului menstrual.

Un alt stimul puternic pentru secreţia ADH este scăderea volumului sanguin. Acest fenomen este evident în special în cazul scăderii volemiei cu cel puţin 15-25%. În unele cazuri, rata secreţiei poate creşte chiar de 50 ori. La baza acestui mecanism stau receptorii pentru tensiunea intraparietală de la nivelul atriilor. Aceştia sunt excitaţi, în mod normal, prin umplerea atrială şi trimit impulsuri către creier, cu efect inhibitor pentru secreţia ADH. În cazul scăderii volemiei şi al diminuării umplerii atriale, apare fenomenul invers, de secreţie crescută de ADH. De asemenea, secreţia ADH mai este stimulată prin diminuarea excitării baroreceptorilor carotidieni, aortici şi pulmonari. Informaţiile provenite de la toţi aceşti receptori pentru monitorizarea volumului de sânge sunt trimise către creier prin fibrele aferente ale nervilor vagi.

Semnalele osmotice şi volemice interferă în mod cert, deoarece mici modificări ale volumului sanguin au drept rezultat intensificarea răspunsului osmotic. Pe de altă parte, diluţia osmotică poate bloca răspunsul la hipovolemie. Integrarea acestor semnale se face, probabil la nivelul nucleului supraoptic hipotalamic. Hipovolemia declanşează, de asemenea, secreţia de renină, care duce la apariţia unui răspuns presor prin intermediul angiotensinei II. Prin stimularea receptorilor specifici de la nivelul organului subfornical, angiotensina II poate creşte eliberarea de ADH, prin intermediul semnalelor transmise de la acest organ către nucleul supraoptic.

Secreţia de ADH mai poate fi stimulată de către senzaţia de greaţă, hipoglicemia acută, deficitul de glucocorticoizi, fumat şi, posibil, de hiperangiotensinemie. Stimulii emetici sunt foarte eficienţi, ei exercitând un efect prompt de creştere a

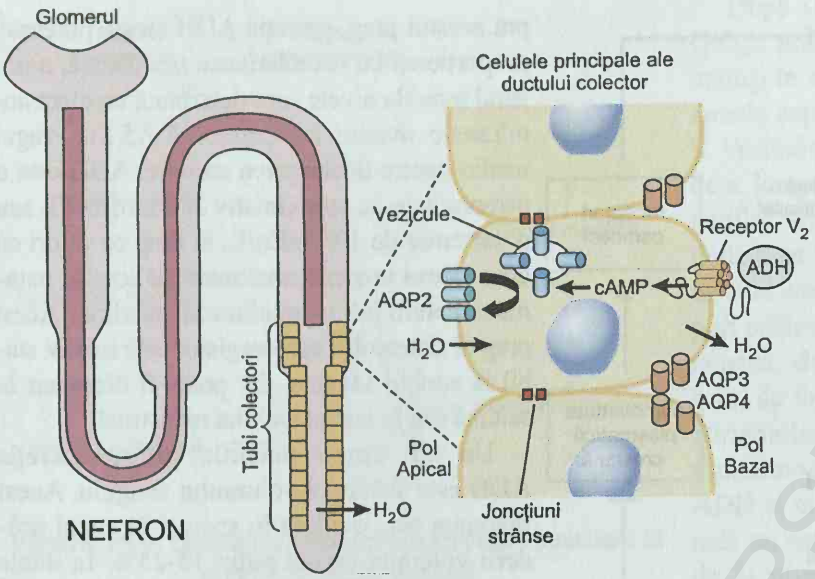


Figura 15.13. Mecanismul acţiunii ADH la nivel renal

nivelului plasmatic al ADH de până la 50-100 ori, chiar şi în cazul în care senzaţia de greaţă este tranzitorie şi nu este însoţită de vărsături.

15.2.1.2 Acţiunea ADH

Principalul efect al ADH este de a reduce eliminarea de apă la nivel renal. În concentraţii crescute, hormonul are, de asemenea, capacitatea de a induce contracţia fibrelor musculare netede prezente în pereţii arterelor şi de a creşte tensiunea arterială, de unde şi denumirea de „vasopresină".

Receptorii pentru ADH sunt de trei tipuri, V1a, V1b şi V2, şi aparţin superfamiliei de receptori cuplaţi cu proteine G.

Activarea receptorilor V1a duce la creşterea activităţii fosfolipazelor, producerea de inositol 1,4,5-trifosfat şi diacilgicerol, activarea protein kinazei C şi mobilizarea calciului intracelular. Receptorii V1a pot creşte concentraţia calciului intracelular şi prin influx din mediul extracelular, în urma cuplării cu canalele de calciu voltaj-dependente, în special de tip L. La nivel vascular, activarea receptorilor V1a determină contracţia fibrelor musculare netede şi creşterea tensiunii arteriale. De asemenea, receptorii V1a au şi un efect mitogen asupra acestor celule. Activarea receptorilor V1a la nivel hepatic poate induce gluconeogeneză şi glicogenoliză, dar acest efect are o importanţă mică în condiţiile unor concentraţii fiziologice de ADH. La nivel cerebral, receptorii V1a sunt distribuiţi pe suprafaţa diverselor clase de neuroni, printre care şi celulele producătoare de ADH; de asemenea, receptorii sunt prezenţi şi la nivelul pituicitelor lobului posterior.

ADH este, de asemenea, sintetizat la nivelul celulelor mici din nucleii paraventriculari şi transportat la nivelul adenohipofizei pe calea sistemului port hipotalamo-hipofizar. Receptorii V1b au o densitate mare pe suprafaţa celulelor corticotrope, iar activarea lor duce la creşterea concentraţiei Ca^{2+} intracelular şi, consecutiv, la eliberarea de ACTH.

Acţiunea fiziologică cea mai importantă a ADH este de a reduce excreţia de apă prin stimularea procesului de concentrare a urinei. Efectul antidiuretic este obţinut prin creşterea permeabilităţii pentru apă a celulelor care mărginesc tubul contort distal şi tubii colectori medulari ai rinichiului (*Figura 15.13*). În absenţa ADH, aceste celule sunt practic impermeabile pentru apă şi absorb foarte puţin din cantitatea mare de urină diluată care provine din regiunea proximală a nefronului. În prezenţa ADH, aceste celule devin permeabile selectiv pentru apă, permiţându-i să difuzeze de-a lungul gradientului osmotic generat de către medulara renală. Prin urmare, urina diluată care trece prin tubii colectori este concentrată, iar volumul ei scade. Amplitudinea efectului este proporţională cu concentraţia plasmatică a ADH.

Mecanismul exact prin care acţionează la nivelul tubilor colectori pentru a le creşte permeabilitatea pentru apă este incomplet cunoscut. În interiorul celulelor epiteliale ale tubilor colectori, imediat sub membrana plasmatică, se găsesc un număr mare de vezicule care prezintă nişte canale înalt permeabile pentru apă, denumite *aquaporine*. Acţiunea ADH asupra acestor celule începe prin cuplarea lui la receptorii specifici V2, care activează adenilat ciclaza şi determină creşterea concentraţiei de AMPc în citoplasmă. Aceasta cauzează fosforilări la nivelul

veziculelor mai sus amintite, ceea ce duce la translocarea aquaporinei 2 (AQP2) la nivelul membranei celulare apicale, oferind o suprafaţă importantă de permeabilitate pentru apă. Acest proces este complet în 5-10 minute. Apa intrată în celulele epiteliale difuzează apoi în interstiţiu prin canalele de apă AQP3 şi AQP4 de la nivelul membranei baso-laterale. Fluxul net de apă prin celulă este determinat de numărul de canale de apă AQP2 de membrana apicală şi de magnitudinea gradientului osmotic dintre fluidul tubular şi medulara renală.

Eliminarea ADH circulant se face în special prin metabolizare hepatică şi renală. În timpul sarcinii, degradarea ADH este crescută de 3-4 ori datorită producerii unei peptidaze N-terminale placentare.

15.2.1.3 Anomalii ale secreţiei sau acţiunii ADH

Deficitul de ADH

Diabetul insipid

Secreţia sau activitatea scăzute ale ADH se manifestă sub formă de diabet insipid (DI), un sindrom caracterizat prin eliminarea unor cantităţi mari de urină diluată. Volumul urinar în 24 ore este >50 mL/kg corp, iar osmolaritatea este <300 mosmol/L.

Deficitul secreţiei de ADH poate fi primar sau secundar. Forma primară rezultă din agenezia sau distrucţia neurohipofizei şi este denumită *DI neurohipofizar, DI hipofizar* sau *DI central*. Această formă poate fi determinată de diverse anomalii congenitale, dobândite sau genetice, dar în mai mult de jumătate din cazuri este idiopatică. Deficitul secundar de ADH poate apărea în cazul inhibiţiei secreţiei prin aport excesiv de lichide.

Defectul primar în acţiunea ADH are ca efect apariţia *DI nefrogen*. Forma genetică este transmisă, de obicei, prin mecanism legat de cromozomul X şi este asociată cu mutaţii în regiunea codantă a genei pentru receptorul V2. Forme autozomal recesive sau dominante de boală pot apărea prin mutaţii ale genei aquaporinei care formează canalele de apă în nefronul distal. Deficitele secundare în răspunsul antidiuretic la vasopresină rezultă din poliuria însăşi. Acestea sunt cauzate de dispariţia gradientului osmotic medular şi/ sau de suprimarea funcţiei aquaporinelor.

Hipernatremia adipsică

Hipernatremia adipsică este caracterizată prin deshidratare hipertonă cronică sau recurentă şi un deficit în răspunsul ADH la stimularea osmotică. În ciuda deshidratării hipertone, aceşti pacienţi nu au senzaţie de sete şi se pot chiar împotrivi recomandării de creştere a aportului oral de lichide. Acest fenomen se datorează ageneziei sau distrugerii osmoreceptorilor hipotalamici responsabili de apariţia senzaţiei de sete şi de reglarea secreţiei de ADH.

Excesul de ADH

Secreţia sau activitatea excesivă a ADH au ca rezultat eliminarea unei urini concentrate şi în cantităţi mici. Dacă fenomenul nu este însoţit de reducerea aportului de lichide, poate apărea retenţie de apă şi scăderea osmolarităţii şi natremiei plasmatice. Dacă hiponatremia se dezvoltă treptat sau este prezentă timp de mai multe zile, aceasta este asimptomatică. Totuşi, dacă hiponatremia se instalează brusc, este însoţită aproape invariabil de semne şi simptome de intoxicaţie cu apă, care pot evolua de la o migrenă de intensitate medie, confuzie, anorexie, greaţă şi vărsături, până la comă şi convulsii (*v. şi 2.6.6*). Hiponatremia severă poate cauza decesul.

Antidiureza inadecvată poate fi cauzată de un defect primar al secreţiei sau acţiunii vasopresinei sau poate fi secundară unor stimuli non-osmotici, precum hipovolemia, hipotensiunea sau deficitul de glucocorticoizi. Formele primare sunt denumite în general *sindroame de secreţie inadecvată de ADH* (SIADH) sau *hiponatremie euvolemică*. Dintre numeroasele cauze de SIADH amintim secreţia ectopică de vasopresină de către neoplasme pulmonare sau de alt tip, eliberarea ADH secundară utilizării unor medicamente, administrarea exogenă de ADH, desmopresină, sau doze mari de oxitocină (*v. şi 2.6.4*).

Formele secundare de antidiureză inadecvată sunt împărţite în două grupuri: hiponatremia hipervolemică (tipul I), respectiv hipovolemică (tipul II). Tipul I apare în stări patologice asociate cu retenţie de sodiu şi apariţia edemelor, precum insuficienţa cardiacă congestivă şi ciroza. Tipul II apare în cazul depleţiei de sodiu, de exemplu în gastroenterite severe, supradozaj de diuretice şi deficit de mineralocorticoizi.

15.2.1.4 Explorarea de laborator a secreţiei ADH

Testul de restricţie a aportului de lichide

Deşi testul este simplu de efectuat şi de interpretat, este adesea efectuat incorect.

1. Evaluarea iniţială a pacientului

- Înainte de începerea testului, trebuie determinată osmolalitatea serică şi urinară.
- Anumiţi pacienţi, în special cei cu polidipsie primară, se pregătesc pentru test printr-un consum considerabil de lichide. O natremie şi o osmolalitate serică scăzute (Na < 135 mmol/L, osmolalitate < 275 mosm/kg) sugerează o încărcare cu apă a organismului şi, astfel, limita de pierdere în greutate în timpul testului poate fi extinsă.
- Alţi pacienţi, precum cei cu diabet indipid sever, pot fi puternic deshidrataţi chiar înainte de începerea testului. La pacienţi cu natremie şi osmolalitate serică crescute (Na>145 mmol/kg, osmolalitate > 295 mosm/kg) şi urină diluată înainte de începerea testului, deprivarea de lichide nu poate fi efectuată.
- Interpretare:
  - Prezenţa diabetului insipid este puţin probabilă la un pacient cu osmolalitatea iniţială serică < 270 mosm/kg sau urinară > 600 mosm/kg.
  - Osmolalitatea iniţială serică > 300 mosm/kg (sau natremia > 150 mEq/L), împreună cu osmolalitatea urinară iniţială < 300 mosm/kg, sunt asociate, probabil, cu diabetul insipid.

2. Deprivarea de lichide

- Testul durează de obicei 8 ore, timp în care pacientul nu trebuie să consume deloc lichide sau alimente.
- Pentru a minimiza disconfortul pacientului, pentru a evita deshidratarea excesivă şi pentru a obţine un maxim de informaţii, testul trebuie început dimineaţa, iar echilibrul hidric trebuie urmărit atent, prin măsurarea în fiecare oră a masei corporale, a osmolarităţii plasmatice şi/ sau a natremiei şi a volumului şi a osmolarităţii urinei.
- Deprivarea de lichide continuă până când pierderea în greutate a corpului depăşeşte 5% din valoarea bazală *sau* osmolalitatea plasmatică depăşeşte 300 mosm/kg *sau* osmolalitatea urinară depăşeşte 600 mosm/kg.
- În timpul testului, se evaluează periodic tensiunea arterială şi pulsul, pentru a detecta eventualele semne de compromitere hemodinamică a pacientului. Dacă acestea apar, testul se întrerupe imediat.
- Interpretare
  - Dacă, în cursul celor 8 ore de deprivare de lichide, volumele de urină emise nu se reduc, osmolalitatea plasmatică nu creşte, iar greutatea corpului nu scade cu mai mult de 5%, poate fi suspectată nerespectarea restricţiei ingestiei de lichide de către pacient.
  - Răspunsul normal la test: în condiţiile pierderii a cel putin 5% din greutatea corporală, osmolalitatea plasmatică rămâne în intervalul de 280-295 mosm/kg, iar osmolalitatea urinară depăşeşte dublul osmolalităţii plasmatice (> 600 mosm/kg).
  - Dacă, în cursul testului, urina nu devine concentrată (osmolalitate > 300 mosm/kg, densitate > 1,010 g/cm^3), în timp ce, fie greutatea corpului scade cu cel puţin 5%, fie osmolalitatea plasmatică sau natremia depăşesc limita superioară a normalului, atunci pot fi excluse polidipsia primară şi defectele *parţiale* de secreţie sau de acţiune a ADH. Aceşti pacienţi au diabet insipid central sau nefrogen. Diagnosticul diferenţial între cele două posibilităţi se poate face în urma administrării de DDAVP (desmopresină).

3. Administrarea unui analog al vasopresinei

- Este necesară supravegherea pacientului după administrarea analogilor de vasopresină în cursul acestui test (de preferat, pacientul este internat), datorită riscului dezvoltării hiponatremiei severe în cazul unui consum de apă.
- Se administrează desmopresină subcutanat sau intravenos (0,03 μg/kg corp) şi se determină osmolalitatea urinară după 1-2 ore.
- Interpretare:
  - Dacă volumul orar urinar scade, iar osmolalitatea urinară creşte cu > 50%, pacientul are *diabet insipid central.*
  - Dacă volumul urinar orar nu scade, iar osmolalitatea urinară nu creşte, pacientul are *diabet insipid nefrogen.*

4. Diagnosticul diferenţial între polidipsia primară, DI central parţial şi DI nefrogen parţial

- Se determină concentraţia plasmatică sau urinară a ADH înainte şi în timpul testului de restricţie hidrică, iar rezultatele sunt analizate în relaţie cu osmolalitatea plasmatică şi urinară, cu ajutorul unor nomograme. Această abordare diferenţiază invariabil DI nefrogen parţial de DI central parţial şi de polidipsia primară. De asemenea, diferenţiază DI central de polidipsia primară dacă hormonul este determinat atunci când osmolalitatea plasmatică sau natremia sunt clar deasupra limitelor normale.
- În cazul în care deshidratarea hipertonă nu este obţinută doar prin restricţia de lichide (cazul cel mai frecvent, când concentrarea urinei este posibilă), este necesară efectuarea unei perfuzii saline hipertone şi repetarea determinării ADH atunci când osmolalitatea plasmatică creşte peste 300 mosm/kg (Na^+ > 145 mmol/L). Acest prag este atins de obicei în 30-120 min de la începerea perfuziei. În timpul administrării perfuziei, se menţine restricţia de lichide.
- În DI central, panta relaţiei dintre osmolalitatea plasmatică şi ADH plasmatic este redusă, dar pragul pentru sete şi pentru eliberarea ADH este normal. Panta acestei relaţii rămâne normală în polidipsia primară şi DI nefrogen.

Factori care influenţează rezultatele:

- nerespectarea restricţiei de lichide şi alimente;
- un aport de fluide > 200 mL pe cale intravenoasă invalidează rezultatele;
- administrarea de substanţe de contrast pentru investigaţii radiologice în ultimele 7 zile înainte de test pot determina o osmolalitate urinară crescută;
- glicozuria prezentă înainte de începerea testului invalidează rezultatele;
- intervenţia unor stimuli non-osmotici pentru secreţia de ADH, precum fumatul, hipotensiunea sau greaţa, invalidează testul. Ultimele două pot apărea la unii pacienţi în urma unor reacţii vagale declanşate în cursul recoltării sângelui. în acest caz, testul va trebui într-o altă zi

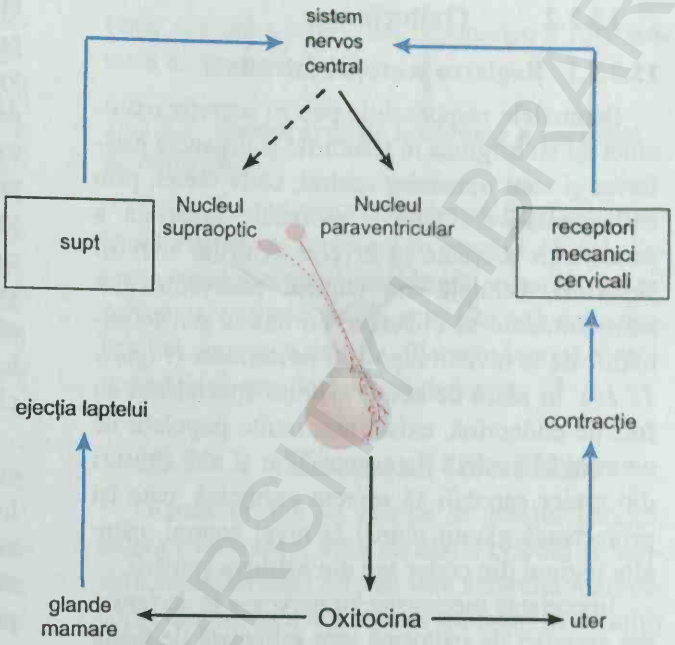


Figura 15.14. Reglarea secreţiei oxitocinei

- determinarea osmolalităţii plasmatice trebuie efectuată din probe de sânge recoltat în tuburi heparinizate. Recoltarea sângelui pe EDTA poate determina creşterea artefactuală a osmolalităţii cu 3-10%.

Aspecte particulare ale determinării concentraţiei ADH circulant

Un fracţiune importantă a ADH circulant este asociat cu plachetele. Prin urmare, diverse situaţii care afectează plachetele pot influenţa nivelele de ADH. S-a demonstrat că probele de plasmă bogate în plachete au nivele de până la 10 ori mai mari decât cele sărace în plachete. De aceea, este importantă centrifugarea corectă a probelor de sânge integral.

Vasopresina este un compus labil care se poate degrada rapid dacă sângele nu este recoltat, procesat şi stocat în mod corespunzător. Probele de sânge trebuie păstrate pe gheaţă, centrifugate imediat după recoltare, iar plasma obţinută trebuie stocată congelată până în momentul efectuării analizei.

Recoltarea sângelui pentru determinarea ADH la femeile însărcinate se face în tuburi care conţin 1,10-fenantrolină pentru a preveni degradarea vasopresinei de către vasopresinaza secretată de placentă.

15.2.2 Oxitocina

15.2.2.1 Reglarea secreției oxitocinei

Semnalele responsabile pentru secreția oxitocinei îşi au originea în țesuturile şi organele periferice şi sunt transmise central, către creier, prin căile senzitive. După o procesare adecvată a semnalelor aferente la nivelul centrilor nervoşi superiori, celulele din nucleul paraventricular sunt stimulate să elibereze hormonul din terminațiile de la nivelul hipofizei posterioare (*Figura 15.14*). În afară de aceşti neuroni specializați cu funcție endocrină, există mai multe populații de neuroni în nucleul paraventricular şi alte situsuri din creier capabili să secrete oxitocină, care îşi proiectează axonii numai la nivel central, către alte regiuni din creier sau din măduva spinării.

Importanța mecanismelor nervoase în declanşarea secreției de oxitocină este subliniată de faptul că aceasta se poate declanşa şi în prezența unui reflex condiționat: uneori, femeile care alăptează pot secreta oxitocină la auzul plânsului copilului, înainte ca acesta să înceapă să sugă.

La femei, oxitocina poate fi secretată, de asemenea, ca urmare a unui mecanism de feedback pozitiv, în timpul naşterii. În acest caz, stimulul pentru secreția de oxitocină este reprezentat de dilatarea cervixului. Semnalul generat de stimul este transmis la creier prin căile aferente, iar creierul, la rândul său, stimulează eliberarea de oxitocină la nivelul neurohipofizei. Hormonul eliberat accentuază contracțiile uterine şi dilatarea cervixului, ceea ce intensifică semnalizarea pentru descărcarea de oxitocină, proces care se continuă până când se produce naşterea fătului.

15.2.2.2 Acțiunea oxitocinei

Intensitatea acțiunii oxitocinei asupra țesuturilor țintă este dependentă de nivelul expresiei receptorilor, de afinitatea şi stabilitatea lor şi de cuplarea lor cu sistemele de semnalizare intracelulară. Atât expresia receptorilor pentru oxitocină, deci densitatea lor pe suprafața celulară, cât şi afinitatea acestora sunt influențate de către steroizi.

Receptorul pentru oxitocină aparține familiei de receptori cu şapte domenii transmembranare cuplați cu proteine G.

Oxitocina a fost considerată, clasic, un hormon „feminin" implicat în parturiție şi în ejecția laptelui. Uterul gravid este un organ țintă important pentru oxitocină, hormon cu efect uterotonic puternic, utilizat în clinică pentru inducerea travaliului. Totuşi, în ciuda utilizării unor tehnici de detecție tot mai sensibile, nu a putut fi pusă în evidență o creştere importantă a nivelului oxitocinei în timpul sarcinii sau a primei etape a travaliului. Femeile cu disfuncție hipofizară posterioară pot avea un travaliu normal şi, la şoarecii knockout pentru gena oxitocinei s-a demonstrat că acest hormon este esențial pentru ejecția laptelui, dar nu pentru fertilitate şi reproducere, inclusiv pentru naştere.

Rolul oxitocinei în parturiție este de a induce contracții uterine puternice în a doua etapă a travaliului, capabile să producă trecerea fătului prin cervixul uterin dilatat şi prin vagin. Apoi, oxitocina este responsabilă pentru contracțiile uterine care produc dezlipirea placentei şi pensarea arteriolelor spirale, cu limitarea hemoragiei postpartum.

Secreția oxitocinei este necesară pentru ejecția laptelui din lumenul alveolelor mamare în ductele secretorii, în timpul alăptării. În acest caz, terminațiile nervoase senzitive de la nivelul mamelonului detectează stimulul şi trimit semnale aferente către sistemul nervos central care, la rândul său, stimulează eliberarea oxitocinei din terminațiile axonilor din hipofiza posterioară. Oxitocina determină contracția celulelor mioepiteliale, iar laptele devine disponibil sugarului. Astfel, curgerea laptelui apare într-un interval de 30 s – 1 min de când copilul începe să sugă.

Oxitocina are însă roluri endocrine şi paracrine în funcția reproducătoare şi la bărbat. În timpul ejaculării, descărcarea rapidă de oxitocină din neurohipofiză în circulația sistemică stimulează contracțiile de la nivelul tractului reproducător cu rol în eliberarea spermei. Oxitocina este sintetizată şi la nivelul testiculului, epididimului şi prostatei, iar prezența receptorilor specifici în tractul reproducător susține acțiunea locală a hormonului. Rolul paracrin al oxitocinei constă în stimularea contractilității tubilor seminiferi, a epididimului şi a prostatei. Oxitocina modulează, de asemenea, nivelul de androgeni la nivelul acestor țesuturi prin stimularea conversiei testosteronului în dihidrotestosteron de către 5α-reductază.

La femei, oxitocina eliberată în timpul orgasmului joacă un rol în fertilizarea ovulului, prin stimularea contracțiilor uterului şi ale trompelor

uterine, care contribuie la transportul spermatozoizilor către extremitatea ovariană a trompelor.

Nivelul oxitocinei plasmatice creşte în timpul excitaţiei sexuale şi, mai mult, în timpul orgasmului. Atât la femei, cât şi la bărbaţi, intensitatea orgasmului este corelată cu nivelul oxitocinei circulante.

Este considerat că oxitocina facilitează interacţiunile sociale şi sentimentul de ataşare la om. Hormonul este implicat în apariţia comportamentului matern. Nivelul oxitocinei este stabil pe toată perioada sarcinii şi este corelat pozitiv cu ataşamentul materno-fetal (determinat pe o scală specifică). Este posibil ca oxitocina să promoveze sentimentul de „grijă părintească" şi de ataşare dintre părinţi şi copii.

Studii recente s-au concentrat asupra modului în care oxitocina promovează sociabilitatea. Se pare că oxitocina este implicată în întreţinerea sentimentului de încredere. De asemenea, oxitocina administrată intranazal creşte generozitatea, dar nu neapărat altruismul. Hormonul pare să afecteze abilitatea de înţelege emoţiile alor persoane, deci influenţează empatia.

Autismul este o afecţiune caracterizată prin relaţii sociale anormale, incluzând anomalii de interacţiune şi de comunicare, precum şi un comportament repetitiv şi stereotip. Mai multe studii indică o asociere a mutaţiilor punctiforme în genele oxitocinei şi receptorului pentru oxitocină cu afecţiuni de tipul autismului. Administrarea intravenoasă de oxitocină la adulţii cu autism reduce semnificativ atât numărul, cât şi severitatea manifestărilor repetitive şi creşte capacitatea de a înţelege şi a-şi aminti componenta afectivă a cuvintelor.

În afară de efectele asupra comportamentului social, oxitocina poate influenţa şi aspecte non-sociale precum memoria non-socială, anxietatea şi stresul.

Oxitocina poate modula răspunsul psihologic şi comportamental la stres, prin influenţa directă sau indirectă asupra axului hipotalamo-hipofizo-suprarenalian. Aceasta poate diminua eliberarea hormonilor de stres atât la om, cât şi la animale. Administrarea intranazală a oxitocinei blochează apariţia stresului social determinat de ţinerea unui discurs în public, situaţie cunoscută ca determinant al creşterii nivelului de cortizol şi al inducerii senzaţiei de stres.

La om, alăptarea scade nivelul de cortizol, iar nivele crescute de oxitocină sunt asociate cu o diminuare a sentimentelor negative. O concentraţie scăzută a oxitocinei plasmatice a fost asociată cu disconfort psihic.

15.2.2.3 Explorarea de laborator a secreţiei de oxitocină

Determinarea concentraţiei oxitocinei plasmatice nu este efectuată curent în practica clinică. Secreţia oxitocinei este considerată pulsatilă, iar recoltarea unor probe de sânge izolate este puţin probabil să surprindă un puls. Placenta secretă o aminopeptidază care degradează oxitocina.

15.3 Hormonii tiroidieni

Glanda tiroidă se găseşte la nivelul gâtului, anterior de trahee, între cartilajul cricoid şi incizura suprasternală. Tiroida este alcătuită macroscopic din doi lobi uniţi printr-un istm. În condiţii normale, cântăreşte între 10 şi 20 g.

Glanda matură este constituită din numeroşi foliculi, compuşi din celule foliculare, care mărginesc coloidul secretat, un lichid bogat în tiroglobulină, proteina precursoare a hormonilor tiroidieni. Celulele foliculare prezintă polarizare structurală: suprafaţa baso-laterală este în contact cu torentul de sânge, iar suprafaţa apicală mărgineşte lumenul folicular.

15.3.1 Sinteza, secreţia şi transportul hormonilor tiroidieni

Biosinteza hormonilor tiroidieni poate fi considerată ca o succesiune de mai multe procese distincte (*Figura 15.15*), care depind de produsii a trei gene exprimate în celulele foliculilor tiroidieni: sistemul co-transportor Na^+/I^-, tireoglobulina şi peroxidaza tiroidiană.

Captarea iodului

Prima etapă în formarea hormonilor tiroidieni este transportul iodului din sânge în celulele glandulare tiroidiene şi în foliculi. În glanda tiroidă normală iodul este concentrat de peste 30 de ori faţă de nivelul plasmatic. Când activitatea tiroidei este maximă, concentraţia iodului intraglandular o poate depaşi pe cea plasmatică de până la 250 de ori. Pentru a realiza concentrarea iodului împotriva acestui gradient însemnat, celulele tiroidiene captează iodul cu ajutorul unei pompe de iod localizate la nivelul unei membrane bazolaterale. Această pompă este de fapt un sistem de sinport Na^+/I^- (NIS) care cuplează tran-

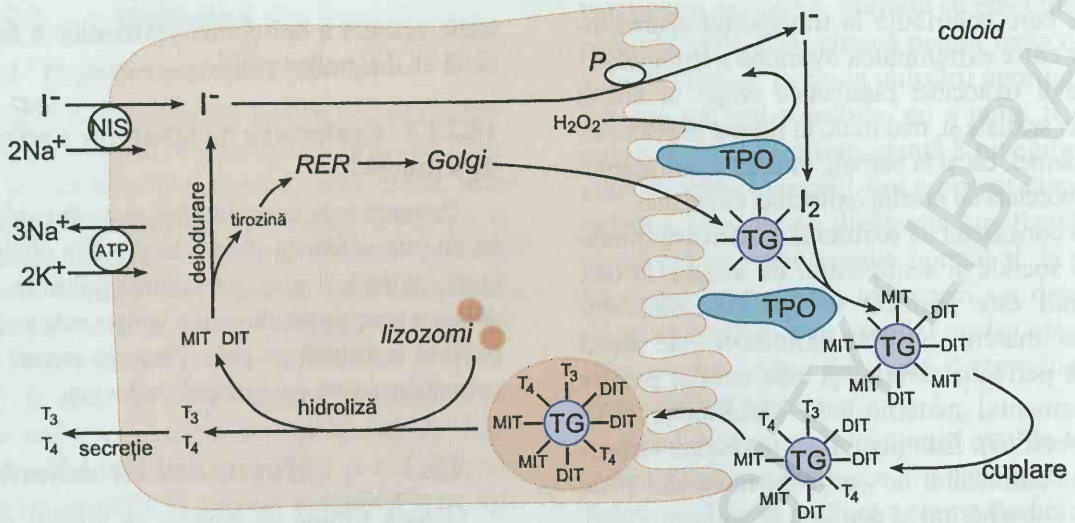


Figura 15.15. Sinteza şi secreţia hormonilor tiroidieni (explicaţiile în text)
NIS = transportor de Na^+/I^-; TG = tireoglobulină; TPO = tireoperoxidază; RER = reticul endoplasmic rugos

sferul a doi ioni de sodiu cu cel al unui ion de iod. Astfel iodul este transportat împotriva gradientului său de concentraţie cu ajutorul gradientului electrochimic pentru sodiu. Pentru a menţine gradientul electrochimic pentru sodiu, Na^+/K^+ ATP-aza elimină trei ioni de sodiu la schimb cu doi ioni de potasiu, cu consum de enrgie. Difuziunea pasivă a potasiului din celulămenţine potenţialul membranar. Ca şi alţi transportori, sistemul sinport Na^+/I^- are o capacitate limitată şi poate fi saturat. Prin urmare, alţi ioni, precum tiocianatul poate competiţiona cu iodul pentru situsurile de legare la transportor şi pot bloca captarea iodului. Această proprietate poate fi exploatată în scopuri diagnostice sau terapeutice.

NIS prezintă expresia cea mai mare la nivelul tiroidei, fiind mai mai puţin exprimat la nivelul glandei mamare în lactaţie si la nivelul placentei. Sistemul de transport al iodului este strâns legat, ceea ce permite adaptarea la variaţiile legate de dietă. Nivelele scăzute de iod cresc expresia NIS şi stimulează captarea, în timp ce nivele crescute de iod au un efect supresor asupra expresiei NIS şi a captării. Expresia selectivă a NIS la nivel tiroidian permite realizarea investigaţiilor izotopice la nivelul glandei, tratamentul hipertiroidismului şi ablaţia cancerului tiroidian cu radioizotopi de iod fără o afectare semnificativă a altor organe.

Aportul zilnic recomandat de iod este 150 µg/zi pentru adulţi, 90-120 µg/zi pentru copii şi 200 µg/zi în sarcină. La indivizii din populatiile cu aport suficient de iod, ioduria este mai mare 10 µg/dL.

Sinteza tireoglobulinei

Tireoglobulina este o glicoproteină care formează un dimer cu masa moleculară de 660 kDa. Tireoglobulina este sintetizată la nivelul ribozomilor, glicozilată în cisternele reticulului endoplasmic, transferată către aparatul Golgi şi înglobată în veziculele secretorii care o descarcă la capătul apical al celulelor tiroidiene (tireocite), în lumenul lobulilor tiroidieni, unde are loc iodurarea ei. Secreţia tireoglobulinei se face în ritmul sinteze, astfel că în tireocite nu există depozite de tireoglobulină.

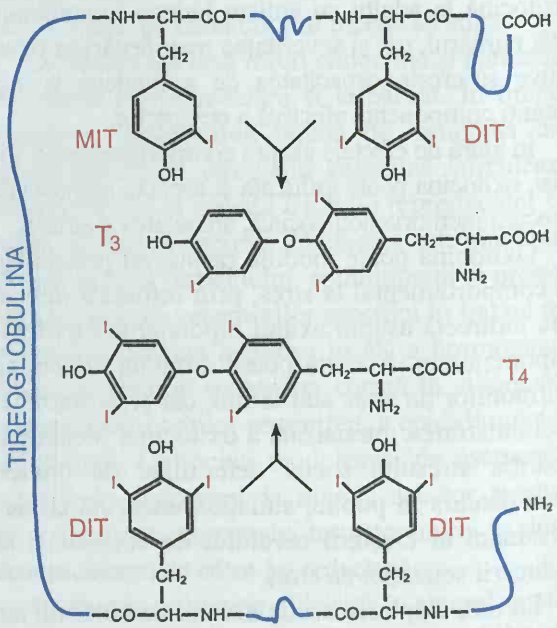


Figura 15.16. Formarea hormonilor tiroidieni prin cuplarea MIT şi DIT

Încorporarea iodului

Iodul care pătrunde în celulele foliculare prin membrana bazolaterală difuzează în celulă şi, pentru a ajunge în lumenul folicular, este exportat la nivelul membranei apicale printr-un transportor de iod independent de sodiu denumit *pendrină.* Tiroida este singurul ţesut capabil să oxideze iodul la o valenţă superioară, etapă obligatorie în organificarea iodului şi biosinteza hormonilor tiroidieni. Această etapă implică o peroxidază care conţine hem şi are loc la suprafaţa luminală a celulei foliculare. Tireoperoxidza, o proteină tetramerică cu masa moleculară de 60 kDa, necesită apa oxigenatăca agent oxidant. Apa oxigenată este produsă de către o enzimă NADPH dependentă asemănătoare citocrom c reductazei. Diverşi compuşi pot inhiba oxidarea iodului şi, deci, încorporarea sa în MIT (monoiodtirozină) şi DIT (diiodtirozină).

Cei mai importanţi dintre acestea sunt medicamentele tioureice utilizate ca agenţi antitiroidieni datorită capacităţii lor de a inhiba sinteza hormonilor tiroidieni în această etapă. Tireoperoxidza este o proteină transmembranară prezentă in marginea în perie a membranei apicale a celulelor foliculare, şi este orientată cu domeniul catalitic către lumenul folicular. Aceasta este enzima cheie în formarea hormonilor tiroidieni. Sub actiune ei, o parte din resturile de tirozină din structura tireoglobulinei sunt iodurate: tirozina este iodurată la monoiodtirozină şi apoi la diiodotirozină. Procesul se desfăşoară cu o eficienţă scăzută, deoarece numai 10 % din resturile de tirozină sunt accesibile iodurării.

Cuplarea

Etapa finală a biosintezei tiroxinei (T4) este reprezentată de cuplarea a doua resturi de DIT pentru a forma T4 în interiorul lantului polipeptidic al tireoglobulinei. Similar, triiodotironina (T3) este obţinută prin cuplarea unui rest de MIT cu unul de DIT (*Figura 15.16*). Şi aceste reacţii sunt catalizate de tireoperoxidază. Doar 20% din resturile de tirozină iodurată suferă procesul de cuplare, restul rămânând sub formă de MIT şi DIT. După cuplare, tireoglobulina este acceptată de către celulele tiroidiene unde este procesată în lizozomi pentru a elibera T3 şi T4.

Depozitarea hormonilor tiroidieni

Tiroida este singura glandă endocrină care îşi depozitează produsul de sinteză extracelular, în lumenul folicular sub forma unor molecule precursoare. Fiecare moleculă de tireoglobilonă conţine până la 30 molecule de tiroxină şi câteva molecule de triiodotironină. Sub această formă hormonii tiroidieni sunt depozitaţi în foliculi într-o cantitate care ar fi suficientă organismului pentru o perioadă de 2 -3 luni.

Secreţia hormonilor tiroidieni

Tireoglobulina nu este eliberată în circulaţie ca atare, prin urmare, T3 şi T4 trebuie iniţial clivaţi de pe molecula de tireoglobulină pentru a fi eliberaţi ca hormoni liberi. În urma stimulării de către TSH, celulele foliculare emit pseudopode la nivelul suprafeţei apicale, care înglobează regiuni din coloidul folicular care este captat astfel în vezicule de endocitoză. În citoplasma celulară lizozomii fuzionează cu aceste vezicule formând vezicule digestive (lizoendozomi) care migrează către membrana bazală. În interiorul acestora tireoglobulina este degradată în fragmente peptidice şi aminoacizi liberi, T3, T4, MIT şi DIT. Dintre aceştia doar T3 şi T4 sunt eliberaţi în circulaţie prin difuziune prin membrana bazală. MIT şi DIT liberi nu pot fi utilizaţi pentru sinteza de tireoglobulină şi sunt rapid deiodurați de către o deiodinază microzomală specifică. Aproape tot iodul eliberat prin acest proces este reutilizat în iodurarea tireoglobulinei. Acest proces de reciclare oferă aproape de două ori mai mult iod pentru sinteza hormonală decât NIS, având astfel o mare importanţă în biosinteza hormonilot tiroidieni.

15.3.2 Reglarea secreţiei hormonilor tiroidieni

Principalul reglator al funcţiei tiroidiene este TSH, este secreatat de către celulele tireotrope din glanda hipofiză (*v. subcapitolul 15.1.3*).

TSH stimulează toate etapele sintezei şi secreţiei hormonilor tiroidieni. De asemenea, are şi un efect trofic pentru glanda tiroidei. O varietate de factori de creştere pot influenţa sinteza hormonilor tiroidieni. Aceştia includ IGF 1, EGF (*epidermal growth factor*), TGF β, endotelinele şi diverse citokine. De exemplu, în acromegalie cantitatea crescută de IGF 1 şi GH sunt asociate cu guşă şi predispoziţie pentru guşă multinodulară. Diverse citokine şi interleukine produse în bolilel tiroidiene autoimune induc creşterea glandei, în timp ce altele duc la apoptoză. Deficitul

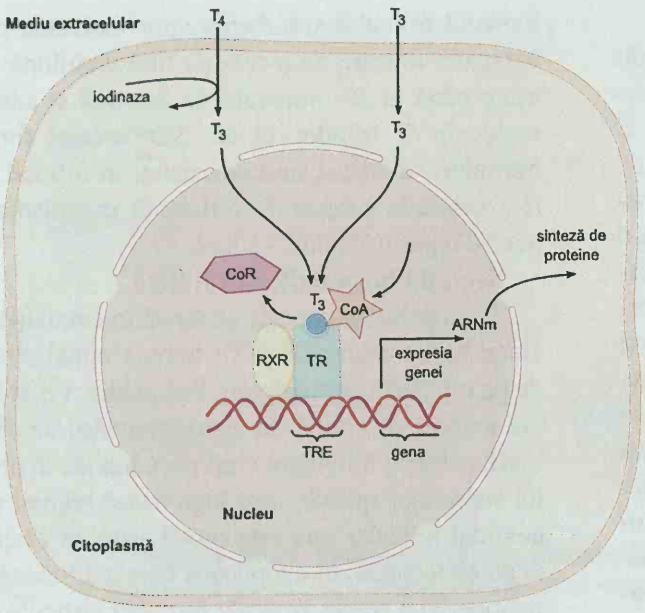


Figura 15.17. Mecanismul acţiunii hormonilor tiroidieni

CoA = coactivatori
CoR = corepresori
TR = receptorul pentru hormoni tiroidieni
TRE = element de răspuns tiroidian
T3, T4 = hormonii tiroidieni

de iod creşte fluxul sanguin tiroidian şi stimulează expresia NIS. Excesul de iod inhibă tranzitoriu organificarea iodului la nivel tiroidian, fenomen cunoscut drept efectul Wolff Chaickoff. Astfel iodura de potasiu inhibă eliberarea hormonilor tiroidieni şi biosinteza acestora. Totusi, la indivizii normali efectul dispare în cateva săptămâni, în timp ce la pacienţii cu guşă multinodulară excesul de iod provenit din medicamente (amiodaronă) sau din substanţe de contrast pot induce tireotoxicoză prin prezenţa în exces a substratului (efect Jod- Basedow).

15.3.3 Acţiunea hormonilor tiroidieni

Majoritatea cantităţii de tiroxină secreatată de tiroidă este convertită în triiodotironină. Efectul general al hormonilor tiroidieni este de a activa transcripţia unui număr mare de gene (*Figura 15.17*) prin urmare, în aproximativ toate celulele organismului sunt sintetizate un număr mare de enzime, proteine structurale, proteine de transport şi alte substanţe, având ca rezultat o creştere generalizată a acetivităţii funcţionale în tot organismul. Hormonii tiroidieni acţionează prin legarea la receptori nuclari specifici (TR-thiroidian receptors) :receptorii hormonilor tiroidieni α şi β. În majoritatea ţesuturilor sunt exprimaţi atât receptorii tiroidieni α cât şi β, dar nivelele lor de expresie variază de la un organ la altul. Receptorii hormonilor tiroidieni conţin un domeniu central de legare de ADN şi un domeniu C- terminal de legare a ligandului. Ei se leagă la secvenţe specifice de ADN denumite elemente de răaspuns tiroidian (thyroid responce elements-TRE) care se găsesc în regiunile promotoare ale genelor ţintă. Receptorii se leagă ca homodimeri sau ca heterodimeri cu receptorii X retinoizi (RXR). Receptorul activat poate fie să stimuleze fie să inhibe transcripiţia genică, în funcţie de natura elementelor reglatorii ale genelor ţintă. După legarea la receptorii tiroidieni, hormonii tiroidieni induc modificări conformaţionale la nivelul acestora care alterează interacţiunea acestora cu factorii de trascripţie. În absenţa legării hormonilor tiroidieni, receptorii se leagă de proteine corepresoare care inhibă transcripţia genică. Legarea hormonilor disociază co-represorii şi permite recrutarea co-activatorilor care intensifică transcripţia. Interacţiune receptorilor tiroidieni cu proteine co-represoare explică de ce expresia genică este abolită în absenţa legării hormonilor. Prin urmare, defiienţa hormonală are un efect profund asupra expresiei genice, deoarece, nu numai că lipseşte stimularea indusă de hormon, dar se produce şi represia genei.

Hormonii tiroidieni cresc activitatea metabolică în aproape toate ţesuturile organismului. Rata metabolismului bazal se poate intensifica cu până la 60-100% peste normal atunci când sunt secretate cantităţi mari de hormoni. La nivel celular hormonii tiroidieni cresc numarul şi acti-

vitatea mitocondriilor, intensifică transportul activ al ionilor prin membranele celulare. Hormonii tiroidieni stimulează metabolismul carbohidraţilor în aproape toate aspectele sale, incluzând captarea rapidă a glucozei de către celule, intensificarea glicolizei, a gluconeogenezei, intensificarea absorbţiei glucidelor la nivel gastrointestinal şi creşterea secreţiei de insulină. Stimularea metabolismului lipidic se manifestă prin mobilizarea rapidă a lipidelor din ţesutul adipos, ceea ce duce la scăderea rezervelor de lipide ale organismului. În paralel apare creşterea nivelelor de acizi graşi liberi în plasmă şi acceleraea oxidării acestora în celule. Creşterea hormonilor tiroidieni determină scăderea concentraţiei de colesterol, fosfolipide si trigliceride din plasmă.

Invers, scăderea secreţiei tiroidiene are efect opus asupra lipidelor plasmatice, cu creşterea riscului cardiovascular. La nivel cardiovascular, hormonii tiroidieni cresc debitul cardiac atât prin creşterea frecvenţei cât şi a forţei de contracţie a inimii. Aceste efcete duc la creşterea fluxului sangiun în ţesuturile periferice ceea ce face ca presiunea arterială medie să nu se modifice. În aceste condiţii, în hipertiroidism, tensiunea arterială sistolică creşte cu 10-15 mmHg, în timp ce tensiunea arterială diastolică scade cu 10-15 mmHg. Alte efecte ale hormonilor tiroidieni includ creşterea frecvenţei respiratorii, a motilităţii gastro-intestinale şi efecte excitatorii asupra SNC. Creşterea hormonilor tiroidieni accelerează secreţia majorităţii celorlalte glande endocrine, dar creşte şi necesitaea ţesuturilor pentru hormoni. De exemplu, secreţia crescută de tiroxină creşte metabolismul glucozei în tot organismulşi, prin urmare determină o nevoie crescută de insulină. Hormonii tiroidieni exercită un efect inhibitor asupra celulelor tireotrope din hipofiza anterioară.

Tiroxina (T4) este principalul hormon secretat de către tiroidă. Întreaga cantitate de T4 din circulaţie este de origine tiroidiană, în timp ce numai a cincea parte din triiodotironina (T3) circulantă este de origine tiroidiană. Majoritatea T3 din sânge este produsă prin monodeiodinarea enzimatică, în poziţia 5', a T4. De fapt, T4 pare a avea funcţia de prohormon pentru producerea T3. În circulaţie, 99,98% din T4 este legat de proteine plasmatice specifice, astfel: globulina care leagă tiroxina (*thyroxine binding globulin*, TBG) transportă 60-75% din T4, transtiretina (*transthyretin/ thyroxine binding prealbumin*, TTR/TBPA), 15-30%, iar albumina, aproximativ 10%. Triiodotironina este transportată, în proporţie de aproximativ 99,7%, legată de TBG. Hormonii tiroidieni, în forma legată de proteine, nu pot pătrunde în interiorul celulelor şi sunt consideraţi inactivi biologic. Funcţia lor este de a asigura o rezervă circulantă de hormoni tiroidieni. Forma liberă a acestora însă poate intra rapid în celule, unde îşi exercită funcţiile biologice. Prin urmare, mecanismele care asigură homeostazia axului hipotalamo-hipofizo-tiroidian funcţionează pentru menţinerea unor concentraţii normale ale formelor libere de hormoni.

O serie de agenţi utilizaţi în scop diagnostic sau terapeutic, precum fenitoina, carbamazepina sau furosemidul, pot inhiba competitiv legarea hormonilor tiroidieni la proteinele transportoare plasmatice, având ca efect o creştere bruscă a fT4 şi o reducere consecutivă a TT4 seric prin mecanism de *feedback*.

Propranololul are un efect inhibitor asupra procesului de conversie a T4 în T3, motiv pentru care este administrat pentru în tratamentul manifestărilor de tireotoxicoză. În cazul administrării propranololului la indivizii fără afecţiuni tiroidiene, aceştia pot prezenta o creştere a nivelului TSH ca urmare a diminuării ritmului de producere a T3 din T4.

15.3.4 Anomalii ale secreţiei sau răspunsului la acţiunea hormonilor tiroidieni

Hipertiroidismul este rar în copilărie, dar afectează toate grupele de vârstă la adult. Aspecte clasice ale hipertiroidismului includ scăderea în greutate în ciuda apetitului crescut, palpitaţii, fibrilaţie atrială, intoleranţă la căldură, anxietate, agitatie, tremor şi slăbiciune musculară. Lărgirea fantei palpebrale poate fi observată în hipertiroidism indiferent de cauză, dar ptoza palpebrală, edemul periorbital, diplopia şi compresia nervului optic apar numai în asociere cu boala Graves. La vârstnici scăderea ponderală şi fibrilaţia atrială sunt comun întâlnite. Fosfataza alcalină şi globulina care leagă hormonii sexuali sunt crescute, poate apărea leucopenie, rar hipercalcemie.

Hipotiroidismul aspecte clinice ale hipotiroidismului sunt asociate cu creştere în greutate, intoleranţă la frig, piele uscată, constipaţie, tulburări de memorie, letargie, încetinirea ideaţiei, menoragie, edem periorbital sau facial, diminuarea auzului.

Cretinismul este cauzat de hipotiroidismul sever în timpul vieţii intrauterine sau copilăriei precoce. Această afecţiune este caracterizată în special prin dezvoltare somatică deficitară şi retard mental. Cretinismul este datorat absenţei congenitale a glandei troide (cretinism congenital), incapacităţii tiroidei de a produce hormoni tiroidieni din cauza unei afectări genetice a glandei sau apare datorită deficitului iodului în alimentaţie (cretinism endemic). Severitatea cretinismului endemic variază mult, în funcţie de cantitatea iodului în dietă.

Rezistenţa la acţiunea hormonilor tiroidieni

Apare cu o frecvenţă de 1:50.000 naşteri şi este determinată, cel mai frecvent, de mutaţii la nivelul genei care codifică pentru TRβ. Aceste mutaţii, localizate în regiunea responsabilă pentru legarea ligandului, duc la pierderea funcţiei receptorului. Totuşi, receptori mutanţi păstrează capacitatea de a dimeriza cu RXR, de a se ataşa la ADN şi de a coopta proteine corepresoare şi acţionează, astfel, ca antagonişti ai receptorilor TRα şi TRβ neafectaţi. Această proprietate este denumită „activitate dominant negativă" şi este răspunzătoare pentru modul autozomal dominant de transmitere a bolii.

Profilul biochimic al acestor pacienţi este caracterizat prin nivele circulante crescute de până la 2-3 ori peste valorile normale ale hormonilor tiroidieni, în prezenţa unor concentraţii serice de TSH normale sau uşor crescute, care răspund la stimularea cu TRH. Această situaţie nu poate fi considerată secreţie inadecvată de TSH, deoarece cantitatea crescută de TSH secretată este necesară pentru a susţine o producere crescută de hormoni tiroidieni, care să compenseze răspunsul diminuat la acţiunea acestora din partea ţesuturilor. În general, pacienţii cu rezistenţă faţă de hormonii tiroidieni nu prezintă semne de hipotiroidism, deoarece rezistenţa este parţială şi compensată. Aceştia pot avea însă guşă, determinată de efectul trofic pe care îl are asupra tiroidei, TSH secretat în cantităţi crescute.

15.3.5 Explorarea de laborator a secreţiei hormonilor tiroidieni

15.3.5.1 Determinarea hormonilor tiroidieni totali

Actualmente, concentraţiile TT4 şi TT3 sunt determinate prin teste imunologice competitive, în majoritate non-radioactive, care utilizează ca generator de semnal enzime, fluorescenţa sau chemiluminiscenţa. Testele pentru hormonii totali necesită includerea în mediul de reacţie a unui agent, precum acidul 8-anilino-1-naftalen-sulfonic sau salicilaţi, care să deplaseze moleculele de hormon de pe proteinele transportoare.

Datorită acestei dependenţe de proteinele transportoare, rezultate anormale la aceste teste pentru TT4 şi TT3 apar mai frecvent ca urmare a anomaliilor care interesează proteinele transportoare specifice decât ca urmare a unor adevărate disfuncţii tiroidiene. Sunt frecvent întâlniţi pacienţi cu modificări fie ale nivelelor TBG, secundare sarcinii sau terapiei cu estrogeni, fie ale structurii proteinelor transportoare, detorate variabilităţii genetice. Alterarea concentraţiei sau afinităţii TBG pentru hormonii tiroidieni poate influenţa relaţia dintre rezultatele testelor pentru hormonii totali şi pentru cei liberi. De asemenea, prezenţa în serul pacientului a altor proteine care pot lega analitul, precum autoanticorpii anti-hormoni tiroidieni, pot compromite utilitatea determinărilor TT4 şi TT3 dacă acestea nu sunt efectuate în asociere cu alte teste.

Intervalele de valori de referinţă pentru hormonii tiroidieni totali sunt redate în *Tabelul 15.II.* Trebuie subliniat că aceste valori sunt dependente de metodele utilizate în efectuarea testelor.

15.3.5.2 Determinarea formelor libere ale hormonilor tiroidieni

În sânge, T4 este mai strâns legat de proteinele plasmatice transportoare decât T3. Prin urmare, fracţiunea liberă a T4 (fT4) este mai mică decât cea a T3 (fT3): 0,02% *vs.* 0,2%, respectiv. Deoarece tehnicile de separare fizică a cantităţilor infime de hormoni liberi de fracţiunile majoritare, legate de proteine, sunt laborioase şi au un preţ ridicat, acestea sunt utilizate în general în laboratoarele de referinţă şi nu sunt disponibile în

Tabelul 15.II. Intervale de valori de referinţă pentru concentraţiile plasmatice ale TSH şi hormonilor tiroidieni la adulţi şi copii

Concentraţia plasmatică normală a TSH şi a hormonilor tiroidieni la adult			
TT4: 60 - 150 nmol/L		**FT4:** 9 - 22 pmol/L	
TT3: 1 - 2,9 nmol/L		**FT3:** 3 - 9 pmol/L	
TSH: 0,4 – 4 mUI/L			
Intervale de valori normale ale concentraţiei plasmatice a TSH şi FT4 la copii			
Vârsta	**TSH (raport valori copii/adulţi)**	**TSH (mUI/L)**	**FT4 (raport valori copii/adulţi)**	**FT4 (pmol/L)**
3 zile	3,65	1,1 - 17	2,3	22 – 49
10 săptămâni	2,13	0,6 - 10	1	9 – 21
5 ani	1,2	0,4 - 6	0,9	9 – 20
14 ani	0,97	0,4 - 5	0,8	8 – 17

laboratoarele clinice de rutină. Acestea din urmă utilizează metode de estimare a concentraţiei hormonilor liberi, care se împart în două categorii: fie calculează un index al hormonului liber, după efectuarea dozării în două etape, fie utilizează diverse forme de imunoteste. Aceste metode de estimare a fracţiunii libere sunt dependente, într-o măsură mai mare sau mai mică, de proteinele de legare plasmatice.

Indexul fT4 şi indexul fT3

Acestea sunt estimări ale nivelelor de hormoni liberi care necesită două măsurători separate. Prima este determinarea hormonului total (TT4 sau TT3), iar cea de-a doua este o evaluare a concentraţiei proteinelor de legare a hormonilor tiroidieni utilizând fie un imunotest pentru TBG, fie un test de captare a T4 sau T3, denumit *raportul de legare a hormonilor tiroidieni (THBR).*

Indexuri care utilizează determinarea TBG

Calcularea indexului fT4 utilizând TBG îmbunătăţeşte acurateţea diagnostică faţă de TT4 numai în cazul în care rezultatul anormal al TT4 este determinat de o concentraţie anormală a TBG. În plus, raportul TT4/ TBG nu ţine cont de alte proteine de legare a hormonului tiroidian şi nici de posibilitatea existenţei unor forme de TBG cu afinitate alterată.

Indexuri care utilizează testul de „captare"

Testele de „captare" sunt utilizate pentru estimarea legării de proteine a hormonilor tiroidieni. În proba biologică este adăugată o cantitate infimă de T3 sau T4 radiomarcat (trasor), iar acesta se distribuie la nivelul proteinelor plasmatice de legare în mod similar cu hormonul endogen. Utilizarea unor cantităţi extrem de mici de hormon radiomarcat nu determină deplasarea echilibrului de legare iniţial. Distribuţia trasorului este astfel dependentă de saturaţia proteinelor de legare. Într-o etapă ulterioară, se adaugă un alt element de legare a hormonului sau un adsorbant (de ex., o răşină schimbătoare de ioni, talc, cărbune activat, particule de polistiren acoperite cu anticorpi etc). Aceasta duce la redistribuirea T3 sau T4 marcat şi realizarea unui nou echilibru care include şi elementul secundar de legare. Cantitatea de trasor sechestrată de către adsorbant este dependentă de saturaţia proteinelor de legare a hormonului: cu cât saturarea proteinelor de legare este mai mare, cu atât cantitatea de trasor din adsorbant este mai mare. Nivelul captării trasorului de către adsorbant este o măsură indirectă a concentraţiei TBG din probă. Când concentraţia TBG este mică, situsurile de legare ale TBG sunt puternic saturate şi, astfel, o cantitate mai mică de trasor adăugat se va fixa de TBG şi o cantitate mai mare de trasor va fi captată pe adsorbant. Invers, când concentraţia TBG este mare, saturarea TBG cu T4 este mică şi o cantitate mai mare de trasor va fi fixată pe TBG, în timp ce mai puţin trasor va fi disponibil captării de către adsorbant. Din păcate, relaţia dintre raportul de legare a hormonului tiroidian şi concentraţia TBG nu este

lineară, astfel că acest mode de calculare a indexului hormonilor tiroidieni liberi nu poate compensa o abatere prea mare a concentraţiei TBG de la valorile normale.

Teste de tip ligand pentru estimarea fT3 şi fT4

Aceste metode folosesc o abordare într-una sau în două etape. Mai precis, testele în două etape efectuează separarea fizică a formei libere de hormon de forma legată de proteine, înainte de măsurarea concentraţiei hormonului liber printr-un imunotest. Alternativ, poate fi utilizat un anticorp pentru imunoextracţia unei părţi a ligandului din proba biologică înainte de cuantificare. Spre deosebire de testele în doi timpi, testele cu o singură etapă încearcă cuantificarea hormonului liber în prezenţa proteinelor de legare. Aşa cum este de eşteptat, testele în doi timpi sunt mai puţin predispuse erorilor artefactuale. Metodele într-o etapă dau rezultate eronate în cazul în care pproba biologică şi standardele utilizate diferă în ceea ce priveşte afinitatea lor pentru trasor.

Intervalele de valori de referinţă pentru fT3 şi fT4 seric

Există o similitudine mai mare între intervalele de referinţă corespunzătoare diverselor teste de tip ligand disponibile laboratoarelor clinice decât între intervalele date de metodele care utilizează separarea fizică a hormonului liber. În general, efectuarea unei etape de separare a formei libere duce la extinderea limitei superioare a intervalului de valori normale.

15.3.6 Aspecte particulare ale explorării de laborator a hormonilor tiroidieni

Hormonii tiroidieni sunt relativ stabili în probele biologice, indiferent dacă acestea sunt stocate la temperatura camerei, refrigerate sau congelate.

Factori care influenţează rezultatele determinării de laborator a hormonilor tiroidieni

Determinarea concentraţiei serice a TT4 şi TT3 este influenţată de **anomaliile proteinelor de legare** a hormonilor tiroidieni. Prin urmare, testele de estimare a fT4 sunt preferate determinării TT4 în cazurile în care concentraţia TBG este anormală. Totuşi, rezultatul testelor pentru fT4 poate fi modificat dacă afinitatea TBG este alterată sau dacă în ser sunt prezente proteine de legare a T4 anormale. Testele pentru hormonii tiroidieni totali ar trebui să fie disponibile pentru investigarea rezultatelor discordante pentru formele libere ale hormonilor.

Sarcina. Creşterea TBG şi scăderea concentraţiei albuminei plasmatice întâlnite în sarcină au ca efect apariţia unor variaţii importante în determinările fT4, care diferă de la o metodă la alta. Metodele dependente de albumină pot produce rezultate fals scăzute pentru fT4 la până la 50% din pacienţi şi nu sunt potrivite pentru evaluarea statusului tiroidian în timpul sarcinii datorită scăderii concentraţiei albuminei serice în timpul trimestrului 3 de sarcină.

Prematuritatea. Un nivel scăzut al T4 în absenţa creşterii TSH este frecvent întâlnit la prematurii născuţi înainte de vârsta gestaţională de 28 săptămâni.

Anomalii ale proteinelor transportoare. Variaţii ereditare sau dobândite ale afinităţii albuminei sau TBG pentru T3 sau T4 pot determina rezultate eronate la dozarea fracţiunilor libere ale acestor hormoni la pacienţi eutiroidieni.

Autoanticorpi. Prezenţa în ser a autoanticorpilor specifici pentru hormonii tiroidieni poate influenţa determinările hormonilor tiroidieni liberi sau totali, iar nivelul erorii diferă de la o metodă la alta.

Tireotoxicoza şi hipotiroidismul. Relaţia dintre nivelul fracţiunii libere şi al celei legate a hormonilor tiroidieni nu este lineară în tireotoxicoză. În tireotoxicoza severă, TT4 şi fT4 nu cresc proporţional. Această non-linearitate este datorată atât diminuării nivelului de TBG, cât şi depăşirii capacităţii de legare a TBG, în ciuda creşterii legării hormonilor tiroidieni la TTR şi la albumină. În hipotiroidism, toate proteinele transportoare ale hormonilor tiroidieni sunt slab ocupate, iar excesul de situsuri libere poate întârzia răspunsul la tratamentul de substituţie.

Medicamente care intră în competiţie cu hormonii tiroidieni pentru situsurile de legare proteice (ex. fenitoina, carbamazepina, furosemidul).

Heparina. Determinarea nivelului seric al fT4 la scurt timp după administrarea unei doze de heparină la pacient poate da rezultate fals crescute, deoarece heparina mobilizează lipoprotein lipaza care, la rândul său, poate creşte nivelul de acizi graşi liberi din proba de plasmă şi astfel dizlocă o parte din hormon de la nivelul situsurilor TBG.

Afecţiuni non-tiroidiene severe. Majoritatea pacienţilor internaţi au nivele serice scăzute ale TT3 şi fT3. Valori scăzute ale TT4 la pacienţi eutiroidieni nu apar însă decât în cazul unor afecţiuni severe, precum sepsisul. Aceşti pacienţi se găsesc, de obicei, internaţi în secţii de terapie intensivă.

Erori tehnice. Nu este recomandată efectuarea de diluţii din specimenele de plasmă sau ser destinate determinării nivelelor fT3 sau fT4 în laboratoarele clinice, deoarece majoritatea testelor utilizate sunt dependente de proteinele de legare plasmatice şi nu prezintă un răspuns linear la diluţii.

15.4 Bibliografie selectivă

1. Bidlingmaier M, Freda PU. Measurement of human growth hormone by immunoassays: current status, unsolved problems and clinical consequences. Growth Horm. IGF Res. 2010 Feb;20(1):19-25.
2. Fischbach FT, Dunning MB. A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
3. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. Clin. Biochem. 2009 Aug;42(12):1205-1217.
4. Goodman HM. Basic medical endocrinology. Academic Press; 2003.
5. Henry HL, Norman AW. Encyclopedia of Hormones. Academic Press; 2003.
6. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition. 16th ed. McGraw-Hill Professional; 2004.
7. Lee M. Basic Skills in Interpreting Laboratory Data. ASHP; 2009.
8. Marks V, Meško D, Cantor T. Differential diagnosis by laboratory medicine. Springer; 2002.
9. Marshall WJ, Bangert SK. Clinical Biochemistry. 2008.
10. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Illustrated Biochemistry. 26th ed. McGraw-Hill Medical; 2003.
11. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition. 4th ed. W. H. Freeman; 2004.
12. Provan A. Oxford handbook of clinical and laboratory investigation. 2005.
13. Radovick S, MacGillivray MH. Pediatric endocrinology. Humana Press; 2003.
14. The Merck Manual Online. http://www.merck.com/mmpe/sec12.html?WT.z_section=Endocrine and Metabolic Disorders
15. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory -- Goals for further developments. Clinical Biochemistry. 2008 Jun;41(9):649-662.
16. Wheeler DMJ, Hutchinson JSM. Hormone assays in biological fluids. 2006.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 16. Considerente practice în determinarea în laborator a hormonilor

Liviu Sorin Enache, Elena Luminița Enache

16.1 Introducere

Funcțiile organismului sunt reglate de două sisteme majore de control: sistemul nervos și sistemul endocrin.

Sistemul nervos și endocrin coordonează și integrează celelalte sisteme din organism și, în același timp, se influențează reciproc.

Sistemul hormonal se ocupă de controlul funcțiilor metabolice ale organismului, reglând intensitatea reacțiilor biochimice din celule, transportul susbstanțelor prin membranele celulare sau alte aspecte ale metabolismului celular, cum sunt creșterea și diferențierea.

Hormonii sunt structuri moleculare organice produse de o celulă sau de un grup de celule specializate (glande endocrine), care au capacitatea de a transmite informația pe cale umorală, la distanță, până la nivelul țesuturilor care au receptori celulari specifici capabili să-i recunoască.

Hormonii pot fi clasificați în funcție de distanța dintre locul de secreție și cel de acțiune. Hormonii endocrini sunt eliberați în circulația sanguină și transportați în tot organismul către celulele țintă. Hormonii paracrini sunt eliberați în spațiul extracelular și difuzează către celulele țintă din apropiere. Hormonii autocrini acționează chiar asupra celulelor care îi secretă, legându-se de receptori celulari de suprafață.

16.1.1 Structura hormonilor

Hormonii prezintă o mare varietate structurală. Majoritatea hormonilor se încadrează însă în una din următoarele categorii biochimice:

- hormoni proteici și polipeptidici – includ hormonii secretați de către hipofiza anterioară și posterioară, pancreas (insulina și glucagonul), glandele paratiroide (parathormonul), calcitonina, somatostatina etc.;
- hormoni steroizi – secretați de cortexul suprarenalelor, ovare, testicule și placentă;
- derivați ai tirozinei – secretați de glanda tiroidă și medulosuprarenală.

Alături de aceste categorii clasice, mai sunt considerați hormoni o serie de molecule precum retinoizii, eicosanoizii, oxidul nitric.

Hormonii peptidici conțin între 3 și 200 resturi de aminoacizi, iar sinteza lor se produce pe calea clasică a expresiei genice: transcripție → ARNm → translație → proteină → procesare proteică post-translațională → hormon. Aceștia sunt sintetizați la nivelul reticulului endoplasmic rugos al diverselor celule cu funcție endocrină, prin același mecanism ca și majoritatea proteinelor. De obicei, în urma translației rezultă molecule mai mari, lipsite de activitate biologică (preprohormoni), care sunt clivate apoi pentru a forma prohormoni la nivelul reticulului endoplasmic. Aceștia sunt apoi transferați aparatului Gol-

gi, pentru a fi stocați în vezicule secretorii. În interiorul veziculelor, anumite enzime clivează prohormonii, dând naștere unor molecule mai mici de hormoni activi și fragmente inactive. În prezența unui stimul care declanșează secreția, veziculele secretorii fuzionează cu membrana celulară și eliberează hormonul în spațiul interstițial, prin exocitoză. Capilarele care deservesc glandele endocrine secretante de hormoni peptidici, sunt fenestrate, deci permeabile pentru peptide, astfel încât hormonii ajung direct în torentul sanguin pentru a putea fi transportați către structurile țintă. Toți hormonii peptidici acționează prin intermediul unor receptori membranari. Interacțiunea hormon-receptor determină generarea unui mesager secund în citosol, care modifică activitatea unei enzime-cheie intracelulare, influențând astfel metabolismul celular.

Hormonii steroizi sunt sintetizați din colesterol, sub acțiunea unor enzime dependente de citocromul P-450. Majoritatea colesterolului aflat în celulele secretante de steroizi provine din circulație, dar aceste celule sunt capabile și să sintetizeze *de novo* colesterolul. Datorită liposolubilității lor mari, steroizii nu sunt stocați în celulele producătoare, ci difuzează liber prin membrana plasmatică pe măsură ce sunt sintetizați. Odată ajunși în sânge, ei sunt transportați către țesuturile țintă legați de proteine transportoare. Toți hormonii steroizi acționează la nivel celular prin intermediul unor receptori nucleari care modulează nivelul de expresie al diverselor gene.

Cele două grupuri de **hormoni derivați din tirozină**, catecolaminele și hormonii tiroidieni, sunt sintetizați sub acțiunea enzimelor citoplasmatice ale celulelor. Catecolaminele produse în creier și în alte compartimente ale sistemului nervos acționează ca neurotransmițători, dar adrenalina și noradrenalina au și activitate endocrină, fiind sintetizate și secretate de către glandele suprarenale. Pe măsură ce sunt sintetizate, catecolaminele sunt depozitate intracelular în vezicule secretorii și, sub acțiunea diverșilor stimuli, sunt eliberate prin exocitoză. În plasmă, catecolaminele circulă în formă liberă sau legate de alți compuși. La nivelul celulelor țintă, acestea acționează prin intermediul unor receptori membranari și determină apariția unor mesageri secunzi intracelulari.

Hormonii tiroidieni sunt sintetizați pornind de la resturile de tirozină ale proteinei precursor tireoglobulină, depozitată în foliculii tiroidieni. Hormonii tiroidieni sunt eliberați prin proteoliză și ajung în sânge. Ei acționează la nivelul țesuturilor prin intermediul unor receptori nucleari.

16.1.2 Controlul secreției hormonale – principii generale

Deși concentrațiile plasmatice ale hormonilor variază în funcție de diverși stimuli, metabolismul tuturor hormonilor cunoscuți este strâns controlat. Controlul prin *feedback* (retroacțiune), atât pozitiv, cât și negativ, este un element fundametal al sistemului endocrin, care asigură un nivel adecvat al activității hormonilor asupra țesuturilor.

Controlul prin feedback negativ este cel mai frecvent întâlnit. După ce un stimul a determinat eliberarea unui hormon, evenimente sau produși apăruți în urma acțiunii hormonului respectiv tind să suprime eliberarea acestuia. Astfel, hormonul sau produșii săi au un efect de feedback negativ care împiedică hipersecreția hormonului sau hiperactivitatea sa în țesutul țintă. Reglarea prin feedback este esențială în înțelegerea principiilor testelor diagnostice în endocrinologie.

Controlul prin feedback pozitiv este mai rar întâlnit și constă în faptul că acțiunea biologică a hormonului determină creșterea secreției acestuia. Un exemplu clasic îl reprezintă descărcarea crescută de hormon luteinizant (LH) de la jumătatea ciclului ovarian, sub acțiunea hormonilor estrogeni. Deși nivele scăzute de estrogeni sunt inhibitorii, creșterea treptată a concentrației acestora stimulează secreția de LH. LH secretat stimulează producția ovariană de estrogeni care, la rândul lor, accelerează eliberarea LH. În cele din urmă, LH atinge concentrația adecvată și se instituie controlul tipic prin feedback negativ.

Reglarea prin feedback poate avea loc la toate nivelele, incluzând etapele de transcripție și translație implicate în sinteza hormonilor și etapele implicate în procesarea și eliberarea hormonilor stocați.

Peste sistemele de reglare prin feedback se suprapun **ritmuri hormonale** importante pentru adaptarea la mediul înconjurător. Schimbarea anotimpurilor, ciclul lumină-întuneric din timpul zilei, somnul, alimentația și stresul constituie exemple de factori de mediu care influențează ritmurile hormonale. Frecvența ritmurilor hormonale este foarte variată. Ciclul ovarian are o durată medie de 28 zile, în timp ce ritmurile tuturor hormonilor hipofizari sunt bazate pe ciclul circadian. Alterarea ritmului somn-veghe poate modifica reglarea hormonală. De exemplu, deprivarea

de somn poate cauza o uşoară hipertensiune arterială şi insulino-rezistenţă. Alte ritmuri endocrine se petrec mai rapid, cu perioade de ordinul orelor. Un exemplu îl constituie pulsurile intermitente de gonadoliberină (GnRH), necesare menţinerii sensibilităţii celulelor hipofizare secretante de hormoni gonadotropi. Expunerea acestor celule la nivele constant crescute de GnRH conduce la desensibilizarea lor şi inhibarea producţiei de gonadotropi, fenomen întâlnit, de exemplu, în tratamentul cancerului de prostată cu agonişti de GnRH utilizaţi pentru scăderea nivelelor de testosteron.

Ritmurile de secreţie hormonală trebuie luate în considerare în interpretarea rezultatelor unor determinări izolate ale concentraţiilor serice ale acestora. Pentru unii hormoni, sunt utilizaţi markeri integraţi, care „acoperă" fluctuaţiile hormonale. De exemplu, cortizolul se dozează din urina de 24 ore, iar ca marker pentru activitatea biologică a hormonului de creştere este folosit IGF-I.

Secreţia hormonilor este reglată de o serie de semnale neuronale şi hormonale organizate ierarhic, în cascadă. La fiecare treaptă a cascadei, un semnal mic determină apariţia unui răspuns mai intens. Funcţionarea axei hipotalamo-hipofizo-suprarenaliene constituie un exemplu elocvent. Semnalul nervos ajuns la hipotalamus determină eliberarea câtorva nanograme de corticoliberină, care stimulează producerea câtorva micrograme de hormon corticotrop. Acesta din urmă acţionează la nivelul glandelor suprarenale şi determină eliberarea câtorva miligrame de cortizol, astfel încât, amplificarea semnalului de-a lungul axei este de mai mult de un milion de ori.

16.1.3 Principii generale în determinarea în laborator a hormonilor

Testările izolate nu pot reflecta statusul endocrin în toate circumstanţele. Testele în dinamică şi cele funcţionale sunt preferate determinărilor nesistematizate în cazul hormonilor cu secreţie discontinuă (ex. hormonul de creştere), ale căror nivele au variaţie circadiană marcată (ex. nivelul cortizolului este influenţat de stres, dar are şi o variaţie diurnă importantă) sau pot fi influenţate de alţi factori (ciclul menstrual, medicaţie, patologii asociate). Medicaţia primită de pacient pentru afecţiuni non-endocrine poate influenţa statusul său hormonal sau rezultatele testelor de laborator. De exemplu, unele neuroleptice cresc nivelul prolactinei circulante, beclometazona administrată pe cale inhalatorie la pacienţii cu astm bronşic scade nivelul cortizolului seric, hidrocortizonul administrat terapeutic în afecţiunile inflamatorii este detectat de testele pentru cortizol etc.

Pregătirea pacientului este deosebit de importantă în testele homonale, ale căror rezultate pot fi influenţate puternic de diverşi factori, precum momentul zilei, stresul, dieta anterioară şi medicaţia. Toate aceste date ar trebui discutate cu personalul din laborator înainte de solicitarea testului şi notate pe buletinul de cerere de analize.

Utilizarea metodei corecte de recoltare a probei biologice este esenţială pentru menţinerea stabilităţii analiţilor şi pentru obţinerea unui rezultat interpretabil. Dozarea insulinemiei necesită separarea imediată a serului după coagularea probei de sânge sau a plasmei de elementele figurate şi îngheţarea promptă a probei. Eşantioanele de sânge recoltate pe EDTA sunt adesea mai stabile decât serul sau decât cele recoltate pe heparină, deoarece EDTA complexează ionii de calciu şi magneziu, care servesc drept coenzime pentru diverse proteaze (inclusiv factorii de coagulare vitamina K dependenţi). Adăugarea de inhibitori de proteaze în probele de sânge poate îmbunătăţi, de asemenea, stabilitatea analitului. Transportul probelor trebuie făcut în condiţii adecvate. Multe laboratoare au protocoale speciale pentru investigaţiile endocrinologice, iar consultarea acestora poate fi benefică pentru obţinerea unor rezultate de încredere.

În general, în cazul suspicionării unei hipofuncţii se fac teste de stimulare (pentru a vedea dacă nivelul hormonal rămâne scăzut), iar în cazul unei hiperfuncţii se fac teste de supresie (pentru a vedea dacă nivelul hormonal rămâne crescut).

Testele de supresie reduc activitatea glandelor normale, dar nu scad şi secreţia autonomă (de exemplu, cea a tumorilor secretante de substanţe cu activitate endocrină).

Interpretarea rezultatelor dozărilor hormonale se face în contextul altor rezultate de laborator. De exemplu, nivelele de PTH sunt interpretate în asociere cu nivelul calcemiei. O calcemie crescută asociată unui PTH crescut indică un hiperparatiroidism, pe când o concentraţie mică a PTH în acest context se datorează mai degrabă unei hipercalcemii de cauză malignă sau de altă cauză.

Nu toate rezultatele care se încadrează în intervalele de valori fiziologice sunt şi „normale". De exemplu, nivele normale de LH şi FSH în condiţiile unor concentraţii foarte scă-

zute ale testosteronului sunt sugestive pentru insuficiența hipofizară.

Rezultatele pot varia în funcție de metoda de laborator utilizată.

16.2 Tehnici de laborator utilizate în diagnosticul bolilor endocrine

În diverse situații clinice sau în aplicații de cercetare, este necesară determinarea nivelului hormonilor circulanți. Detecția chimică a acestora este însă dificilă datorită concentrațiilor extrem de mici în care se găsesc în lichidele biologice, în comparație cu analiții clasici din biochimia clinică. De exemplu, hormonul tireotrop, se găsește în circulație în concentrații în domeniul femptomolar (10^{-15} M) la pacienții cu tireotoxicoză.

Înainte de apariția tehnicilor specializate necesare unor astfel de determinări, hormonii erau cuantificați în unități, în funcție de răspunsul biologic pe care îl produceau. Astfel, o unitate de insulină este definită ca o treime din cantitatea necesară pentru a produce scăderea glicemiei unui iepure sănătos, de 2 kg, până la un nivel la care apar convulsiile, în decurs de 3 ore.

În general, metodele de dozare a hormonilor se împart în 3 categorii: metode imunologice – *immunoassays (v. și Capitolul 11.3)* –, metode cromatografice – *chromatography* (*v. și Capitolul 11.2*) – și spectrometria de masă – *mass spectrometry* (MS).

16.2.1 Metodele imunologice

În general, aceste metode se bazează pe specificitatea interacțiunii antigen-anticorp și întrebuințează:

- un anticorp specific pentru analitul de detectat,
- un al doilea anticorp specific pentru analit, marcat cu un trasor, sau o formă modificată a analitului (analitul marcat),
- un sistem de separare a trasorului legat de complexele imune de cel nelegat.

În realizarea testelor pentru dozări hormonale sunt utilizați atât anticorpi policlonali, cât și monoclonali. ***Anticorpii policlonali*** sunt obținuți în urma imunizării, cu structura țintă, a unor animale, precum iepurii sau oile. Acest lucru este ușor de realizat în cazul hormonilor polipeptidici umani, deoarece sunt imunogeni, iar structura lor diferă, în general, de cea a hormonilor prezenți la animale. Aceste condiții sunt suficiente pentru obținerea unui răspuns imun la animal în urma injectării hormonului uman nemodificat. Unii hormoni, însă, precum steroizii, au molecule prea mici pentru a fi imunogeni (pot avea doar rol de haptene). În plus, structura hormonilor steroizi este aceeași la om și la animale. Aceștia pot deveni imunogeni în cazul în care sunt cuplați cu proteine cu rol de *carrier* (precum albumina). Conjugatul obținut este suficient de mare pentru a fi imunogen și, datorită diferenței de structură dintre albumina umană și cea a animalului gazdă, poate induce un răspuns imun. Procesul de obținere a ***anticorpilor monoclonali*** este mai complex și implică fuzionarea limfocitelor B ale animalului imunizat, cu celule mielomatoase. Celulele-hibrid obținute sunt crescute în medii de cultură selective, iar diversele clone sunt separate, testate și selectate în funcție de proprietățile anticorpilor pe care îi secretă. Toți anticorpii produși de o clonă vor fi identici (monoclonali) și vor recunoaște un singur epitop din structura antigenului.

Trasorii atașați analiților sau anticorpilor pot fi radioactivi, precum ^{125}I (în testele radioimune: RIA), enzimatici, precum fosfataza alcalină sau peroxidaza din hrean (în testele imunoenzimatice: ELISA), chemiluminiscenți (de ex., esteri de acridin-orange), fluorescenți (ex. fluoresceina) sau atomi din categoria lantanidelor (de ex., europiu sau terbiu). Cele mai frecvent utilizate sunt metodele bazate pe trasori radioactivi sau enzimatici.

Principalul avantaj al *trasorilor radioactivi* este că măsurarea semnalului generat de aceștia este relativ lipsită de interferențe și poate fi amânată mai multe zile dacă este necesar. Radioizotopii sunt ușor de detectat chiar și în concentrații mici. Procedurile de marcare cu izotopi radioactivi sunt simple și nu influențează interacțiunea antigen-anticorp. În schimb, utilizarea radioizotopilor este costisitoare, prezintă numeroase riscuri iar aceștia necesită proceduri de monitorizare și eliminare complexe. În plus, dezintegrarea radioactivă impune înlocuirea periodică a componentului marcat.

Marcajul enzimatic înlătură riscul de iradiere și de contaminare radioactivă, dar poate fi influențat de substanțe care interferă cu activitatea enzimatică sau cu citirea spectrofotometrică.

Markerii chemiluminiscenți sunt utilizați în testele pentru dozări hormonale, atât în format competitiv, cât și în sandwich.

Teste utilizând luminol sau esteri de acridinium ca substrate luminogene au fost dezvoltate pentru dozarea hormonilor hipofizari, tiroidieni și steroizi. Avantajul testelor prin chemiluminiscență,

față de cele cromogene, este sensibilitatea crescută. Trecerea de la un test cromogen la unul prin chemiluminiscență poate îmbunătăți limita de detecție de 10 ori, iar utilizarea de compuși potențatori, o poate scădea de până la 200 ori. Testele prin chemiluminiscență pentru tiroxina liberă (fT_4) pot avea limite de detecție de până la 20 pM în ser, iar cele pentru triiodotironina (fT_3) liberă au limita de detecție în ser de 3 pM.

Modelele de imunoteste cel mai frecvent utilizate pentru dozările hormonale sunt cele de tip sandwich și cele competitive.

16.2.1.1 Testele de tip sandwich

În *testele de tip sandwich (testele imunometrice)* sunt utilizați doi anticorpi diferiți care recunosc determinanți antigenici diferiți ai hormonului. Un anticorp (anticorpul de captură) este cuplat la un suport solid, precum particulele de agaroză, sau este adsorbit pe suprafața godeurilor unei microplăci. Prin adăugarea probei biologice, hormonul prezent în aceasta este legat de anticorp. Un al doilea anticorp, de data aceasta marcat cu un trasor, este adăugat în mediul de reacție și se atașează la hormonul fixat de primul anticorp. Anticorpul secundar în exces este spălat, iar cantitatea de trasor rămas fixat la suprafața de reacție este proporțională cantitatea de hormon din probă. Frecvent, trasorul utilizat pentru marcarea anticorpului de detecție din acest tip de teste este o enzimă (ELISA) sau un compus chemiluminiscent.

În testele imunometrice, este important ca anticorpul de captură să fie în exces față de hormonul prezent în probă, astfel încât întreaga cantitate de hormon să rămână în mediul de reacție. Când cantitatea de antigen se apropie de capacitatea de legare a anticorpului de captură, relația de linearitate dintre semnal și cantitatea de hormon se pierde. În cazul în care cantitatea de hormon este în exces față de anticorpul de captură, semnalul poate chiar să scadă, în urma unui efect de postzonă. Acest fenomen a fost întâlnit în cazul dozărilor de prolactină la pacienții cu prolactinoame mari. Repetarea testului pe un eșantion de ser diluat va da, în acest caz, un semnal mai mare decât în cazul probei nediluate.

O altă problemă pentru testele de tip sandwich este prezența în serul pacientului a anticorpilor heterofili, care reacționează încrucișat cu antiserul din reactivi. Anticorpii heterofili sunt, în majoritatea cazurilor, anticorpi anti-șoarece, dar există și anticorpi umani anti-animal cu specificitate pentru alte specii. Pacienții pot dezvolta anticorpi anti-animal în diverse situații: în urma imunoterapiei sau procedurilor imagistice care utilizează anticorpi murini, prin expunere la proteine animale de la animalele de companie sau prin contaminarea alimentelor sau prin expunere profesională, la îngrijitorii de animale. În mod normal, anticorpul semnal din reactivii testului nu rămâne atașat de anticorpul de captură decât în prezența antigenului specific (hormonul), cu care formează un sandwich. Anticorpii heterofili divalenți se pot lega simultan la anticorpul de captură și la anticorpul semnal, cauzând apariția unui semnal fals crescut. În prezent, se încearcă limitarea acestei interferențe prin utilizarea în teste a anticorpilor chimerici sau a unor agenți de blocare a anticorpilor heterofili. Succesul unor astfel de abordări tehnice este însă variabil.

În afară de utilizarea în laborator a unor sisteme de îndepărtare a anticorpilor heterofili din probă, prezența unei astfel de interferențe mai poate fi investigată în două moduri:

- trimiterea probelor cu rezultate „suspecte" la alt laborator, pentru a fi testate prin altă metodă;
- diluția probei în diluentul specific testului, în ser din care lipsește hormonul de dozat sau în calibratorul zero; de exemplu, în cazul detectării unor nivele crescute de TSH neconcordante cu diagnosticul clinic și cu celelalte investigații, diluarea probei se poate face utilizând ser de la un pacient cu tireotoxicoză. În cazul prezenței unei interferențe, lipsește adesea paralelismul dintre intensitatea semnalului și gradul diluției. Pentru o bună siguranță, ar trebui efectuate cel puțin două diluții.

16.2.1.2 Testele competitive

Formatul de *test prin competiție* este utilizat frecvent în cadrul testelor radioimune (RIA). În aceste metode, antigenul de dozat (hormonul) intră în competiție cu un antigen radiomarcat din compoziția reactivilor, pentru un număr limitat de situsuri de legare ale anticorpului din mediul de reacție. Componentele de bază ale unui imunotest competitiv sunt: antiserul specific pentru antigenul de detectat (hormonul), antigenul marcat care se leagă la acest antiser și antigenul nemarcat prezent în probă sau în calibratori. Pentru a exista competiție între cele două tipuri de antigen, anticorpul trebuie să fie suficient de diluat pentru a nu

putea lega întreaga cantitate de antigen din mediul de reacție. În general, diluția anticorpului permite legarea a doar 40-50% din antigenul marcat, în condițiile absenței antigenului din probă.

Pe scurt, într-un astfel de test, un eşantion biologic care conține o cantitate necunoscută de hormon, este pus în contact cu o cantitate cunoscută de anticorp şi de hormon marcat radioactiv. Hormonul nemarcat intră în competiție cu hormonul marcat pentru legarea la anticorp: cu cât există mai mult hormon nemarcat în probă, cu atât mai puțin hormon marcat se va lega la anticorp. Trasorul radioactiv legat de anticorp este apoi separat, prin diverse metode fizico-chimice, de trasorul liber şi se determină raportul dintre intensitatea radiației produse de forma legată, respectiv de cea liberă. Cantitatea de hormon prezentă în probă este apoi estimată prin compararea raportului obținut cu o curbă standard construită utilizând cantități cunoscute de hormon nemarcat în loc de probe biologice.

Limitele de detecție a antigenelor prin RIA sunt foarte joase (sub 10^{-12} M). Timpul necesar pentru realizarea unei determinări prin RIA este însă lung, iar capacitatea de procesare este limitată. De exemplu, metoda de referință în Marea Britanie pentru determinarea ACTH plasmatic, are nevoie de 4 zile pentru a fi efectuată.

Datorită flexibilității de utilizare şi a disponibilității pe scară largă în laboratoare a spectrofotometrelor şi a contoarelor de radiații, au fost dezvoltate o multitudine de teste pentru dozările hormonale. În acest context, programele de control extern al calității au documentat discrepanțe mari între rezultatele dozărilor hormonale obținute de la un laborator la altul sau de la o metodă la alta. Variabilitatea concentrațiilor determinate pentru același eşantion depăşeşte 100% în multe cazuri. Bineînțeles, neconcordanțele dintre teste influențează interpretarea clinică a rezultatelor.

Limitele de detecție ale imunotestelor depind atât de afinitatea mare a anticorpilor pentru haptene sau antigene, cât şi de limitele de detecție ale trasorilor (markerilor) utilizați. Limita de detecție este de obicei definită drept concentrația analitului care produce un semnal egal cu media semnalelor produse de blank plus două sau trei deviații standard. Astfel, se defineşte intervalul de confidență pentru răspunsul testului în absența analitului. În timp ce limitele inferioare de detecție permit compararea performanțelor diverselor imunoteste în regiunea inferioară a concentrațiilor detectabile ale analitului, aceste valori nu dau nici o informație despre felul în care se comportă testele în prezența unor concentrații mai mari sau în diverse situații clinice.

Heterogenitatea formelor hormonilor prezenți în circulație şi diferențele de specificitate ale imunotestelor pentru aceste forme fac dificilă calibrarea şi armonizarea rezultatelor. Mai mult, două imunoteste calibrate cu același preparat de referință pot da rezultate mult diferite la analiza probelor de la pacienți.

O explicație constă în faptul că fiecare imunotest identifică un spectru limitat de izoforme, determinat de epitopii care pot fi recunoscuți de anticorpii utilizați de către test. Antiserurile policlonale, fiind reprezentate de un amestec de mai mulți anticorpi cu specificități diferite, sunt capabile să identifice mai multe forme ale aceluiaşi hormon. Spre deosebire de acestea, testele care utilizează anticorpi monoclonali recunosc doar una sau câteva dintre izoformele circulante. Prin urmare, rezultatele obținute la aceeaşi probă biologică, cu ajutorul testelor cu anticorpi policlonali, sunt în general mai mari decât cele obținute utilizând anticorpi monoclonali. În plus, raportul concentrației diverselor izoforme ale hormonilor poate varia de la un individ la altul şi în funcție de situația clinică, astfel încât diferențele de rezultate tind să fie mai mari între testele care utilizează anticorpi monoclonali decât în cazul celor cu anticorpi policlonali.

Deşi se obțin relativ uşor, dezavantajul principal al antiserurilor policlonale este limitarea cantitativă. Producătorii de reactivi pentru imunoteste sunt nevoiți să apeleze la mai multe surse pentru a susține fabricarea kiturilor pe scară largă. Schimbarea surselor de antiser pot atrage modificări esențiale ale performanțelor testelor. În cazul în care laboratoarele şi clinicienii nu sunt informați în privința acestor schimbări, pot apărea probleme în luarea deciziilor terapeutice.

Limitarea majoră a imunotestelor este aceea că ele determină mai degrabă proprietățile imunologice decât pe cele biologice ale moleculelor, deoarece regiunea din molecula hormonului care este recunoscută de anticorpi nu este neapărat aceeaşi cu cea recunoscută de receptor (biologic activă). Prin urmare, o moleculă de hormon inactivă biologic poate să îşi păstreze proprietățile antigenice. Un exemplu îl reprezintă parathormonul, a cărui regiune activă este la capătul ami-

no-terminal al moleculei, în timp ce regiunea carboxil-terminală eliberată prin degradarea parțială a hormonului are o stabilitate mare și rămâne mult timp în circulație, reprezentând peste 80% din parathormonul imunoreactiv plasmatic. Utilizarea în terapie a antagoniștilor receptorilor hormonali poate aduce, în anumite cazuri, dificultăți în dozarea hormonilor corespunzători. Unii antagoniști competitivi sunt obținuți prin modificarea regiunii hormonului recunoscute de receptor. Având în vedere că antagonistul își păstrează proprietățile antigenice ale regiunii nemodificate și faptul că medicamentul este prezent în circulație în concentrație mult mai mare decât hormonul endogen, rezultatele testelor de dozare hormonală pot fi puternic influențate. Mai mult, biasul indus poate fi atât pozitiv cât și negativ, în funcție de perechea de anticorpi utilizați de metodele în sandwich. Dacă atât anticorpul de captură, cât și cel de semnal interacționează cu compusul activ al medicamentului, rezultatul obținut va fi mult mai mare decât concentrația reală a hormonului. Dacă, în schimb, doar unul dintre cei doi anticorpi interacționează cu antagonistul hormonal, atunci rezultatul va fi mult scăzut, deoarece este împiedicată formarea sandwich-ului cu hormonul endogen din probă.

Un factor important care influențează comparabilitatea rezultatelor testelor este preparatul de referință (standardul) utilizat pentru calibrarea testului. De exemplu, în cazul dozării hormonilor hipofizari au fost utilizate inițial preparate standard de extract de hipofiză. Întrucât concentrația reală a diverșilor hormoni nu era cunoscută, au fost atribuite arbitrar valori, exprimate în U/mg, în funcție de activitatea biologică a acestor preparate. Odată cu dezvoltatea tehnicilor de biologie moleculară, au fost realizate preparate standardizate de hormoni peptidici recombinanți puri, ale căror concentrații reale sunt ușor de determinat. Totuși, pentru a permite o comparație oarecare cu vechile preparate standardizate, și acestor preparate recombinante li s-au atribuit valori de activitate exprimate în U/mg. Utilizarea simultană de către unii producători de teste, a unui preparat standardizat obținut din extras hipofizar și, de către alții, a hormonului recombinant, reduce comparativitatea între rezultate.

Matricea probei biologice joacă un rol important în imunoteste, efectul său fiind mai pronunțat decât în alte metode de analiză. Prin *matrice* se înțelege ansamblul constituenților din probă, în afara analitului de interes. În imunoteste, reacțiile sunt adesea foarte sensibile la prezența proteinelor, a lipidelor, enzimelor sau la forța ionică. Hormonul de creștere (GH), spre exemplu, circulă în sânge legat, în proporție de până la 50%, de GHBP (proteina transportoare a hormonului de creștere, *growth hormone binding protein*), care este, de fapt, domeniul extracelular al receptorului pentru GH. Concentrația GHBP în circulație depinde de factori nutriționali și metabolici. În cazul utilizării în imunoteste a unor anticorpi care recunosc regiunea GH care se leagă de GHBP, o creștere a concentrației proteinei transportoare va duce la o subestimare a concentrației hormonului circulant. Acest fenomen este mai frecvent întâlnit în prezent, în condițiile utilizării metodelor noi, care utilizează anticorpi monoclonali și timpi scurți de incubare în scopul adaptării la platformele de testare de capacitate mare.

16.2.2 Tehnici cromatografice

Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) este o îmbunătățire a tehnicilor clasice de cromatografie în coloană. Viteza și rezoluția analizei sunt crescute cu ajutorul unor metode noi de pregătire a coloanelor și prin pomparea cu presiune înaltă a eluentului prin coloană.

HPLC este o tehnică valoroasă pentru analiza hormonilor, din mai multe motive:

- aplicarea temperaturilor înalte nu este necesară,
- fracțiunile separate prin coloană pot fi recuperate și utilizate pentru alte tipuri de analize,
- HPLC oferă posibilitatea separării diverselor forme ale hormonilor, precum steroizii liberi de cei conjugați, pro-hormonii de hormoni și de fragmentele peptidice de degradare etc. Toate aceste forme pot fi dozate în timpul aceluiași test.
- Tehnica nu este dependentă de disponibilitatea unor reactivi imunologici unici.

Tehnicile imunologice, precum ELISA, oferă o soluție pentru dozarea rapidă a steroizilor totali prezenți în proba biologică, care poate fi utilizată în mod sistematic. Totuși, pentru identificarea și dozarea diverșilor corticosteroizi separat, sunt necesare analize cromatografice suplimentare. Pentru această aplicație, cromatografia în gaz oferă o sensibilitate mai mare decât HPLC, în special pentru compușii endogeni.

Utilizarea HPLC în dozările hormonale este limitată de sensibilitatea relativ mică a sistemelor de detecție în UV incluse în instrumentele HPLC. De aceea, tehnicile cromatografice sunt

cuplate cu metode de detecție mai sensibile precum spectrometria de masă sau testele imunologice. Cuplarea cu imunoteste a fost realizată pentru dozarea steroizilor, a tiroxinei și peptidului inhibitor gastric.

Pentru determinări cantitative, se introduc diverse standarde interne în probă. Un număr mare de steroizi sintetici sau alți hormoni sunt disponibili în acest scop. Datorită utilizării pe scară largă a tratamentelor cu hormoni steroizi, există posibilitatea interferenței compușilor exogeni cu testele de dozare. În aceste condiții, se pot utiliza simultan două standarde interne diferite, de exemplu, 19-nortestosteronul și 6-metilprednisolona, pentru a preveni apariția rezultatelor eronate, indiferent dacă pacientul urmează un tratament cu hormoni sexuali sau cu corticoizi.

16.2.3 Spectrometria de masă

Un spectrometru de masă are trei componente principale: *sursa de ioni* are rolul de a produce ioni în stare liberă pornind de la proba de analizat; aceștia sunt propulsați, cu ajutorul unor câmpuri electrice sau magnetice, de către *analizorul de masă,* care îi separă în funcție de masa (m) și sarcina (z) al acestora, astfel încât numai ionii cu un anumit raport m/z ajung la *detector,* producând un semnal electric.

Spectrometrele de masă operează sub vid pentru a evita interacțiunea ionilor și electronilor cu aerul. Sursa de ioni este încălzită pentru ca moleculele să se găsească în fază gazoasă. Moleculele probei sunt fragmentate în spectrometrul de masă în funcție de tipul procesului de ionizare și de tăria legăturilor chimice din interiorul moleculei. Ansamblul de fragmente ionizate generate, cu masa într-un anumit interval de valori, reprezintă o amprentă a moleculei: spectrul de masă.

Spectrul indică, de fapt, abundența fragmentelor care ajung la detectori, în funcție de raportul între masa și sarcina acestora (m/z). Spectrul poate fi comparat cu cele existente într-o bibliotecă de spectre ale compușilor cunoscuți. Utilizând informațiile oferite de spectru se poate calcula formula empirică, iar din natura fragmentării se poate deduce structura completă a moleculei.

Pentru analiza cantitativă, intensiatea semnalelor asociate cu moleculele ionizate și cu fragmentele lor poate fi corelată cu cantitatea de analit din probă. Spectrele de masă obținute din amestecuri de substanțe sunt adesea prea complexe pentru a putea fi utilizate, astfel că spectrometrul de masă este frecvent folosit ca detector pentru un sistem de separare, precum HPLC.

Pentru realizarea determinărilor cantitative, este importantă introducerea unui standard intern în probă pentru a compensa pierderile de analit în timpul pregătirii probei și variațiile sensibilității de detecție de către spectrometru. Standardul intern ar trebui să aibă o structură similară cu cea a analitului. În mod ideal, standardul intern este obținut prin încorporarea unor izotopi stabili în moleculele de interes, tehnică denumită *spectrometrie de masă cu diluție izotopică.*

Spectrometria de masă cuplată cu cromatografia lichidă este utilizată în prezent pentru dozarea unui număr mare de hormoni, incluzând steroizi, neuropetide, melatonină, ADH și tiroxină.

Instrumentele de spectrometrie de masă în tandem (MS/MS) conțin două sau mai multe analizoare de masă succesive, dintre care unul este utilizat pentru fragmentarea controlată a ionilor proveniți de la sursa de ioni, iar altul, pentru selectarea fragmentelor care vor ajunge la detector. Avantajele esențiale ale cuplării HPLC cu MS/MS, pentru medicina de laborator, includ:

- **Specificitatea analitică** foarte mare a MS/MS ca metodă de detecție pentru produșii separați prin HPLC rezultă din utilizarea masei moleculare a analitului și a comportamentului său specific de dezintegrare ca principiu de detecție.
- **Intervalul larg de aplicabilitate:** pot fi identificați un număr mare de compuși. Spre deosebire de GC-MS (cromatografia în gaz cuplată cu spectrometria de masă), HPLC-MS/MS nu este limitată la molecule volatile. Pregătirea probelor este în general simplă și nu include tehnici de derivatizare.
- **Flexibilitatea:** teste noi pot fi dezvoltate în laborator, cu un grad mare de flexibilitate și în timp scurt.
- **Bogăția de informații:** în timpul unui singur test, pot fi obținute o multitudine de rezultate cantitative sau calitative, deoarece pot fi efectuate analize multiparametrice aproape în paralel. De exemplu, pot fi dozați hormonii steroizi și metaboliții acestora.

Totuși, datorită complexității tehnice a sistemelor HPLC-MS/MS, costului mare al echipamentului și nivelului ridicat de pregtire necesar personalului utilizator, această tehnologie este disponibilă doar în centre specializate.

16.3 Tipuri de produse biologice utilizate pentru dozări hormonale

Majoritatea determinărilor hormonale sunt efectuate din probe de *sânge*. Abilitatea de a detecta modificări rapide ale nivelului hormonilor circulanți ca răspuns la stimuli reprezintă un avantaj, dar poate fi și un posibil dezavantaj în cazul descărcării pulsatile a unor hormoni. Dezvoltarea tehnicilor intraoperatorii rapide de determinare a nivelelor PTH și GH subliniază importanța probelor de plasmă, în cazul cărora nu este necesară așteptarea coagulării, spre deosebire de obținerea serului.

În anumite situații se preferă determinarea hormonilor și a metaboliților acestora din *urina* de 24 ore. Aceasta oferă o evaluare globală a producerii unui hormon sau a unui metabolit de-a lungul zilei, utilă în cazurile în care nivelul secreției hormonului nu este constant. O limitare a metodei este incertitudinea colectării întregii cantități de urină de către pacient. Determinarea creatininei în proba de urină de 24 ore oferă un control intern pentru acuratețea recoltării, mai ales dacă este interpretată în asociere cu masa musculară a pacientului. Creatinina urinară poate fi utilizată pentru normalizarea rezultatelor unor determinări hormonale. Determinări efectuate uzual din probe de urină recoltată de-a lungul a 24 ore includ: cortizolul liber urinar, 17-hidroxicorticosteroizii, 17-cetosteroizii, acidul vanililmandelic, metanefrina, catecolaminele etc. Întrucât mulți hormoni circulă în sânge legați de proteine, excreția lor în urină depinde atât de funcția renală, cât și de cea hepatică.

În cazul cortizolului, progesteronului, estradiolului și testosteronului, determinări ale concentrațiilor pot fi efectuate din *salivă*, iar rezultatele se corelează bine cu concentrația plasmatică.

Un sistem convenabil este recoltarea și transportul de *picături de sânge uscate* pe hârtie de filtru și măsurarea concentrației hormonilor din acestea.

Bibliografie selectivă

1. Bidlingmaier M, Freda PU. Measurement of human growth hormone by immunoassays: current status, unsolved problems and clinical consequences. Growth Horm. IGF Res. 2010 Feb;20(1):19-25.
2. Fischbach FT, Dunning MB. A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
3. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. Clin. Biochem. 2009 Aug;42(12):1205-1217.
4. Goodman HM. Basic medical endocrinology. Academic Press; 2003.
5. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Williams Textbook of Endocrinology. 11th ed. A Saunders Title; 2007.
6. Marks V, Meško D, Cantor T. Differential diagnosis by laboratory medicine. Springer; 2002.
7. Mikkelsen SR, Cortón E. Bioanalytical Chemistry. 1st ed. Wiley-Interscience; 2004.
8. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition. 4th ed. W. H. Freeman; 2004.
9. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory -- Goals for further developments. Clinical Biochemistry. 2008 Jun;41(9):649-662.
10. Wheeler DMJ, Hutchinson JSM. Hormone assays in biological fluids. 2006.

BCU IAȘI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 17.
ADN – organizare, replicare şi reparare

Ştefan Hobai, Octavian Popescu

17.1. Organizarea structurală a ADN

Structura şi funcţiile celulelor eucariote sunt mai complexe decât cele ale celulelor procariote. **Nucleul,** unul din cele mai remarcabile organite ale eucariotelor, este depozitarul informaţiei genetice. Cantitatea de informaţie genetică conţinută în celulele eucariote este enormă: o celulă umană conţine de aproape o mie de ori mai mult ADN decât o celulă de *E. coli,* ceea ce în termeni informatici înseamnă că celula umană specifică aproape un miliard de biţi de informaţie. Această informaţie este codificată în secvenţa moleculelor de ADN care formează **cromozomi** caracteristici fiecărei specii în parte. Materialul cromozomal din nucleul celulelor organismelor eucariote este **cromatina.** Aceasta este alcătuită din lungi molecule dublu catenare de ADN, o cantitate aproape echivalentă ca masă de mici proteine bazice numite **histone,** o cantitate mai mică de proteine acide nehistonice, mai mari decât histonele şi o cantitate minoră de ARN. Între proteinele nehistonice se găsesc enzime implicate în replicarea şi repararea ADN, precum şi cele implicate în sinteza, procesarea şi transportul în citoplasmă al moleculelor de ARN. Histonele, joacă un rol important în condensarea moleculelor de ADN şi sunt implicate în reglarea genetică. Studiile electrono-microscopice ale cromatinei au relevat particule sferice dense numite **nucleozomi**. Aceste particule, care sunt unităţile repetitive ale cromatinei, sunt constituite prin înfăşurarea moleculei de ADN în jurul unui octamer de histone. ADN-ul dintr-un singur cromozom uman formează aproximativ un milion de nucleozomi.

17.1.1. Niveluri de organizare a cromatinei

Există 5 tipuri de histone clasificate în două grupe: (i) histone de 4 tipuri - **H2A**, **H2B**, **H3**, **H4**, şi (ii) histone de tip **H1**. Histonele nucleozomale formează partea centrală a nucleozomului; histonele H3 şi H4 sunt printre cele mai conservate proteine cunoscute, prezentând un grad înalt de omologie între diferite specii de eucariote. Mai mult, secvenţele de aminoacizi ale histonelor H3 şi H4 sunt aproape invariabile pentru toate plantele şi animalele. O măsură a conservabilităţii genetice a unei proteine este **perioada unitară de evoluţie** (UEP) definită ca durata medie necesară înlocuirii, ca rezultat al unei mutaţii, a unui aminoacid din 100. În cazul H4, aceasta este de 600 milioane de ani, mult mai mare decât a citocromului *c*, de 20 milioane de ani. Histonele H1, mai puţin conservate genetic, sunt slab asociate cu segmentele de ADN care leagă nucleozomii unul de altul, segmente numite „linkers"care constau din 30 de perechi de baze (pb) sau perechi de nucleotide. Nucleozomii şi segmentele de legătură au aspectul unui „şirag de perle" (*Figura 17.1*).

Moleculele de H1 pot fi îndepărtate cu uşurinţă prin şoc osmotic cu soluţie salină, după care cromatina devine solubilă. Acest fapt sugerează că histona H1 ajută cromatina să adopte structuri insolubile.

Într-un nucleozom, un segment dublu catenar palindromic de ADN de 146 pb este supraînfăşurat (un helix la stânga) în jurul unui **octamer** histonic în formă de disc. Structura cuaternară a oc-

tamerului este $(H2A)_2(H2B)_2(H3H4)_2$. Asamblarea histonelor nucleozomale pentru a se forma octamerul este prezentată în *Figura 17.2*. Imaginea nucleozomului uman, obținută prin rezolvare cristalografică (difracție de raze X), poate fi văzută folosind CD-ul atașat acestei cărți. Codul Protein Data Bank (PDB) al acestei structuri este 2CV5 iar imaginea a fost obținută folosind interfața grafică Maestro din pachetul de programe Schrödinger, versiunea 2009, aflat la autori. Pe același CD sunt înscripționate și alte imagini și fișierele de coordonate atomice corespunzătoare ale moleculelor, rezolvate cristalografic sau soluționate prin RMN, pentru care, pe firul textului sunt precizate codurile PDB între paranteze drepte. Ele sunt accesibile *online* la San Diego Supercomputer Center, www.rcsb.org. Unele imagini au fost create folosind interfețele Jmol (Java) și RasWin. În plus, sunt înscripționate câteva filmulețe de animație și filme video necesare pentru o mai bună înțelegere a textului capitolelor referitoare la transmisia informației genice. Denumirile acestora sunt menționate în text între paranteze drepte.

Octamerul protejează ADN-ul împotriva acțiunii digestive a nucleazelor. Histonele din octamer interacționează numai parțial cu suprafața moleculei de ADN, deși capetele N-terminale ale histonelor nucleozomale se extind în afara nucleozomilor și sunt accesibile pentru a fi modificate covalent în scop reglator. Ansamblul de proteine histonice aflat în cel mai intim contact cu ADN-ul este tetramerul $(H3H4)_2$. Cele 2 molecule de H3 din structura acestui tetramer își inseră segmente α-elicoidale în șanțurile minore ale ADN. Cele 4 tipuri de histone nucleozomale sunt supuse la cel puțin 6 tipuri de modificări covalente: acetilare, metilare, fosforilare, ADP-ribozilare, ubiquitinilare și „sumoilare" (de la SUMO - **small ubiquitin-like modifier**). Aceste modificări joacă roluri importante: (i) acetilarea, metilarea și ubiquitinilarea histonelor sunt asociate cu activarea sau represia transcrierii; (ii) ADP-ribozilarea histonelor este asociată cu repararea ADN-ului; (iii) sumoilarea este asociată cu represia transcrierii.

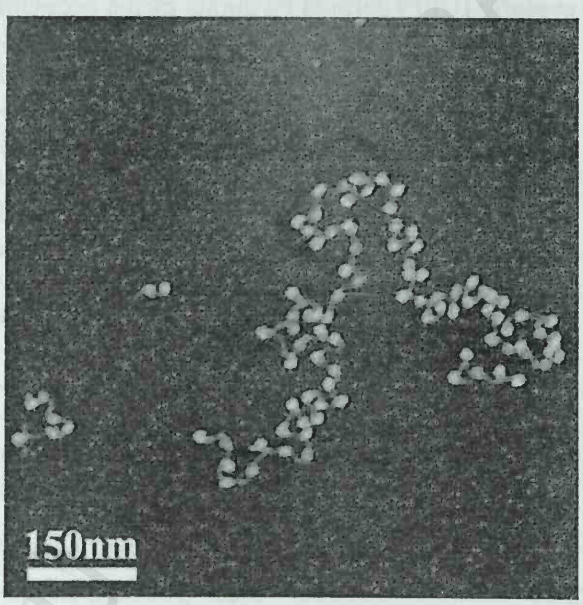


Figura 17.1. Imaginea nucleozomilor obținută prin tehnica microscopiei de forță atomică (reprodusă aici prin bunăvoința prof. Zhifeng Shao, Universitatea Virginia).

Nucleozomii reprezintă primul nivel de organizare a cromatinei, cel al fibrilelor de 10 nm. Ei sunt primul stadiu al condensării ADN-ului deoarece înfășurarea acidului nucleic în jurul octamerilor de histone contribuie la împachetarea ADN-ului prin descreşterea extinderii liniare. Un segment de ADN de 146 pb are în stare dizolvată într-o soluție o lungime de 50 nm în timp ce un nucleozom, care „condenseaza" aceeași cantitate de ADN, are un diametru de 7 nm ceea ce corespunde la un raport de împachetare de 7. Totuși, raportul de împachetare al cromozomilor umani aflați în metafază este 8.000 ceea ce sugerează existența unor nivele superioare de organizare a cromatinei. Al doilea nivel de organizare a cromatinei este constituit de fibre de 30 nm rezultate prin supraînfășurarea fibrilelor de 10 nm pentru a forma o structură solenoidală, stabilizată de molecule de histone H1. Raportul de impachetare la acest nivel de organizare este în jur de 50. Al treilea nivel de organizare constă în bucle necondensate (300 nm) sau condensate (600 nm) de cromatină care conțin câteva zeci de mii de perechi de baze, ancorate la un schelet de susținere numit **matrice nucleară**. Raportul de împachetare la acest nivel este în jur de 8.000. În filmul de animație [anim-org] sunt prezentate nivelele de organizare a ADN schematizate în *Figura 17.2*.

Necesitatea înaltei condensări a ADN-ului este impusă de faptul că lungimea sa este de milioane de ori mai mare decât diametrul nucleului unei celule eucariote. Supraînfășurarea reduce mult spațiul ocupat de ADN pentru ca acesta să încapă în nucleu. La reducerea volumului ocupat contribuie și proporția de împachetare - mai mult de 80% din ADN este împachetat în nucleozomi. Ansamblarea nucleozomilor este mediată de un factor de ansamblare a cromatinei nucleare și este fa-

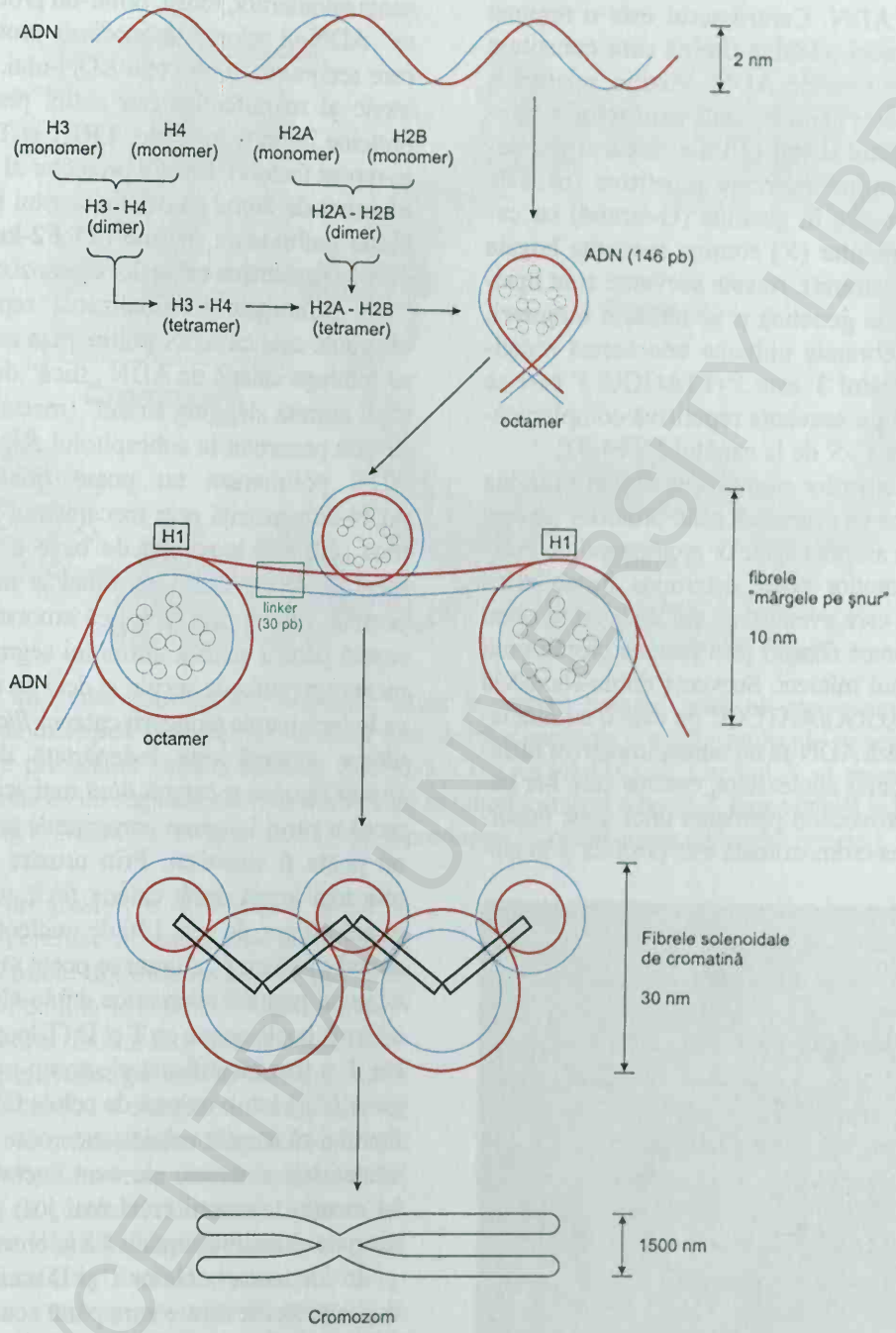


Figura 17.2. Nivelele de organizare a ADN în organismele eucariote.

cilitată de **chaperone** ale histonelor, un grup de proteine care se asociază cu mare afinitate la histone [2IO5]. De îndată ce nucleozomul s-a format histonele sunt eliberate din asocierea cu chaperonele. Formarea nucleozomilor interesează anumite regiuni ale moleculelor de ADN care nu sunt aşezate la întâmplare în molecula acidului nucleic ci acolo unde secvenţele nucleotidice sunt suficient de flexibile pentru a se acomoda la starea supraînfăşurată în nucleozomi. Distribuirea neîntâmplătoare a acestor regiuni are o denumire ce provine din limba engleză – **phasing**.

17.1.2. Cromozomi, telomeri, telomerază

În cursul metafazei cromozomii adoptă o structură caracteristică, cu „braţele" scurte (p) şi lungi (q). În această fază cromozomii mamiferelor posedă o simetrie binară, cu două **cromatide** identice („surori") conectate printr-un **centromer**. Fiecare cromatidă conţine o moleculă dublu

elicoidală de ADN. Centromerul este o regiune bogată în perechi adenină-timină care constituie secvenţe repetitive de ADN. Poziţia relativă a cromatidelor este caracteristică pentru un cromozom dat. Capătul distal (3') ale fiecărui cromozom liniar conţine secvenţe repetitive (până la câteva mii) bogate în guanină (G-strand) iar capătul complementar (5') conţine secvenţe bogate în citozină (C-strand). Aceste secvenţe sunt lipsite de informaţie genetică şi se numesc **telomeri**. La toate vertebratele unitatea telomerică repetitivă de la capătul 3' este 5'-TTAGGG-3' care se împerechează cu secvenţa repetitivă complementară 3'-AATCCC-5' de la capătul 5' [143D].

În lipsa telomerilor cromozomii ar putea fuziona cap-la-cap ceea ce sugerează rolul protector pe care telomerii îl au asupra capetelor cromozomilor. Fuziunea cromozomilor poate determina instabilitatea cromozomală care eventual se soldează cu moartea celulară, deoarece deseori prin fuziune cromozomii se rup în cursul mitozei. Secvenţa dublu-elicoidală repetitivă TTAGGG/AATCCC pe care o numim telomer protejează ADN-ul nu numai împotriva fuziunii ci şi a atacului nucleazelor, enzime care l-ar putea degrada provocând pierderea unor gene importante. Fuziunea cromozomală este posibilă şi în prezenţa telomerilor, totuşi, printr-un proces de „căpăcire" ADN-ul telomeric asociază proteine specifice care sechestrează capetele ADN-ului. ADN-ul telomeric al mamiferelor este astfel protejat cu două proteine înrudite între ele, **TRF1** şi **TRF2** (telomere-repeat factors). Efectul protector al TRF2 este demonstrat de faptul că deleţia acestui factor în fibroblaste embrionare murine (**TRF2-knockout**) conduce la fuzionarea capetelor cromozomale.

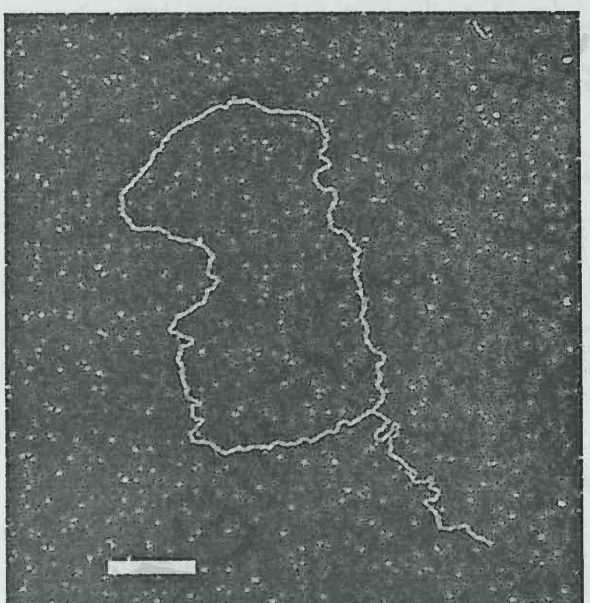


Figura 17.3. Imaginea micrografică a unei molecule telomerice conţinând o buclă T de 17,2 kb şi o prelungire de 6,5 kb, aflate într-o fracţiune îmbogăţită în telomeri care a fost extrasă dintr-o cultură de celule GM847 (bara este de 4 kb). (reprodusă aici prin bunăvoinţa prof. Jack Griffith, Universitatea Carolina de Nord).

O dificultate în finalizarea replicării pe căi obişnuite este că ADN polimeraza nu poate sintetiza întreaga catenă de ADN „fiică" de-a lungul matriţei numită „lagging strand" (mecanismul replicării este prezentat la subcapitolul *Replicarea ADN*). ADN polimeraza nu poate finaliza replicarea ADN-ului matriţă prin mecanismul întârziat deoarece „citirea" secvenţei de baze a ultimului segment de la capătul 3'-terminal al matriţei nu este posiblă. Cauza este faptul că amorsa (**primer**) necesară pentru sinteza ultimului segment al matriţei nu are un punct de sprijin şi deci nu se poate implica în terminarea elongării catenei *fiice*. Atunci când ultima amorsă este îndepărtată de pe *lagging strand* rămâne o catenă *fiică* mai scurtă cu un segment a cărui lungime corespunde telomerului care nu poate fi sintetizat. Prin urmare catena matriţă este mai lungă decât catena *fiică* cu acel segment monocatenar, de cca. 150 de nucleotide, numit „G-strand overhang". Acesta se poate răsuci înapoi, de-a lungul regiunii telomerice dublu-elicoidale, pentru a forma bucle notate cu T şi D (T-loop, D-loop). **Bucla T** a fost identificată electrono-microscopic (*Figura 17.3*) într-o cultură de celule GM847. În ciuda faptului că acestor celule canceroase le lipseşte activitatea telomerazică, ele sunt "nemuritoare", adică îşi menţin telomerii (vezi mai jos) printr-un mecanism de alungire alternativă a telomerilor.

În formarea buclelor T şi D sunt implicate mai multe proteine dintre care până acum au fost identificate 6. Cele mai bine cunoscute sunt TRF1 şi TRF2 menţionate mai sus, la care se adaugă **POT1** (protection of telomeres 1), **Rap1** (Ras-associated protein 1), **TPP1** (tripeptidilpeptidaza 1) şi **TIN2** (TRF1 & TRF2-interacting nuclear protein 2). Aceste proteine formează un amplu complex numit „**shelterin**" (*Figura 17.4*). Asocierea unor componente ale acestui complex între ele şi cu duplex-ul telomeric a fost studiată folosind tehnicile de rezolvare structurală 3D menţionate ([1WOT] pentru interacţiunea TRF1-telomer, [3BQO] pentru sistemul TRF1-TIN2, ş.a.).

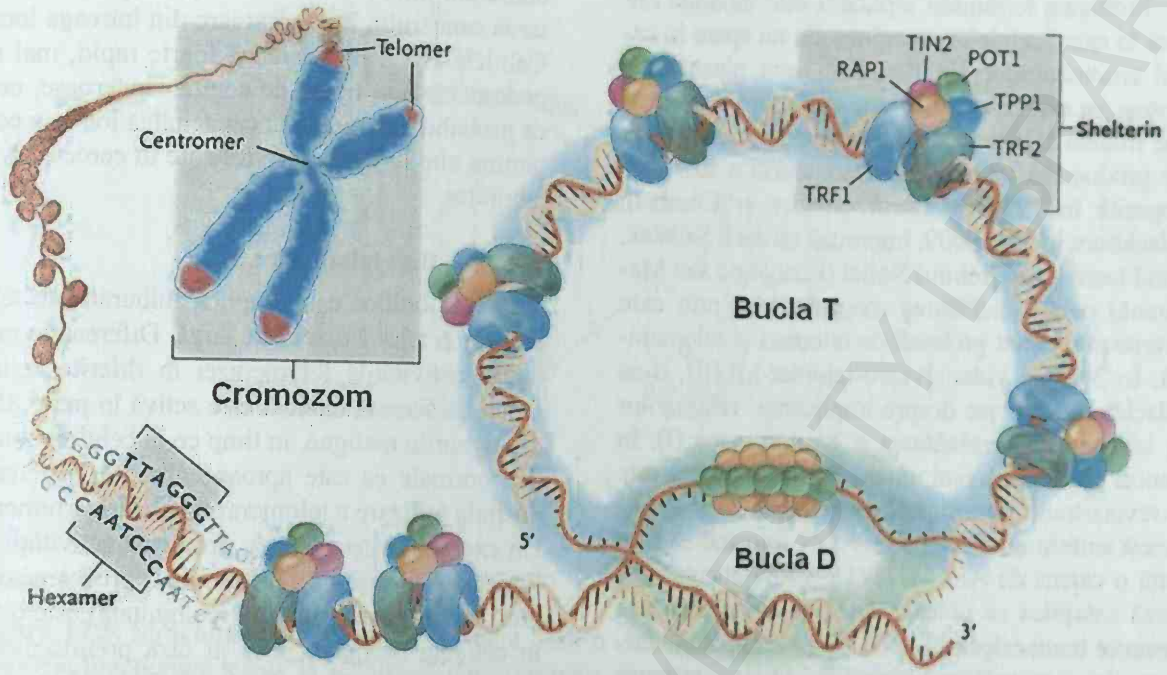


Figura 17.4. Imaginea unui duplex telomeric situat la capătul braţului scurt al unei cromatide dintr-un cromozom. Este înfăţişată asocierea moleculelor complexului *shelterin* şi a altor molecule proteice la duplexul telomeric. Este prezentată explicit unitatea repetitivă TTAGGG/AATCCC. Capătul 3' al catenei telomerice *directe* se termină cu un segment neîmperecheat care se pliază formând o buclă T. Este vizibilă şi bucla D (New England Journal of Medicine, 2009;361:2353-65, reproducere cu permisiunea editorului revistei).

Scurtarea progresivă a telomerilor până la epuizarea lor conduce la senescenţă replicativă, fază în care celulele diploide nu se mai pot divide, adică ciclul celular este blocat. Leonard Hayflick a demonstrat fenomenul senescenţei replicative prin experimente pe culturi de celule fetale la care a evidenţiat o limitare a numărului de diviziuni între 40 şi 60 (**limita Hayflick**). Aceste date au încheiat controversa creată de ipoteza lui Alexis Carrel că celulele sunt nemuritoare. S-a văzut că limita Hayflick depinde de specie, astfel, în culturi celulare normale speciile longevive au celule care trăiesc mai mult timp: celulele de broască ţestoasă se divid de mai multe ori decât cele de om, care se divid de mai multe ori decât cele de şobolan.

Dificultatea de finalizare a replicării l-a preocupat în 1972 şi pe James Watson care i-a dat denumirea *problema terminării replicării* (**end replication problem**). El a semnalat atunci incapacitatea ADN polimerazei de a copia întreaga catenă matriţă rămânând necopiat un fragment de la capăt. Pentru Alexei Olovnikov problema terminării replicării era cauza scurtării progresive a capetelor telomerice ale cromozomilor şi funcţionează ca un cronometru molecular care stabileşte numarul maxim de diviziuni celulare de-a lungul vieţii controlând în mod direct procesul îmbătrânirii.

Culturile de fibroblaste au constituit un bun model pentru cercetarea efectelor scurtării până la epuizare a telomerilor. Practic, aceasta determină deprotejarea capetelor cromozomale afectate ceea ce induce activarea proteinei de supresie tumorală p53, numită aşa deoarece poate fi identificată prin electroforeză în poliacrilamidă ca având o masă moleculară aparentă de 53 kDa. Activarea ei poate fi consecinţa acţiunii unei largi game de factori (stresul oxidativ, şocul termic/osmotic, depleţia telomerică etc.) şi constă în fosforilarea domeniului N-terminal catalizată de protein kinaze cum sunt MAPK (**mitogen-activated protein kinase**) sau ATM (**ataxia telangiectasia mutated**). p53 activată induce senescenţa replicativă a fibroblastelor cultivate, cauzează îmbătrânire prematură, declanşează apoptoza şi suprimă puternic formarea tumorilor. Dacă p53 suferă mutaţii sau nu se sintetizează, disfuncţia telomerică este urmată de fuziunea cap-la-cap a cromozomilor, rezultând cromozomi cu 2 centromeri care în cursul mitozei se rup iar capetele rezultate stimulează translocarea, alte consecinţe fiind **aneuploidia** şi cancerul (datorat în special disfuncţiei p53).

Problema terminării replicării este întâlnită numai în cazul celulelor eucariote. Ea nu apare în cazul cromozomilor circulari cum sunt plasmidele. Totuşi, ea este rezolvată graţie existenţei unei enzime numită **telomerază.** Aceasta este responsabilă de producerea telomerilor. Telomeraza a fost descoperită în 1985 de Carol Greider şi Elisabeth Blackburn în anul 2009, împreună cu Jack Szostak, fiind laureaţi cu Premiul Nobel (Fiziologie sau Medicină) pentru elucidarea mecanismului prin care cromozomii sunt protejaţi de telomeri şi telomerază. În 3 filme video [video-telomer-I,II,III], d-na Blackburn vorbeşte despre implicarea telomerilor şi telomerazei în sănătatea şi bolile umane (I), în cancer (II) şi în stresul uman (III). Telomeraza este o revers-transcriptază, adică o enzimă care catalizează sinteza unei catene de ADN folosind ca matriţă o catenă de ARN [3KYL]. Componenta proteică catalitică se notează cu **TERT (telomerase reverse transcriptase)** [3DU6] iar componenta ribonucleică matriţă se notează cu **TERC (telomerase RNA component)**.

Prin resintetizarea telomerilor, telomeraza previne scurtarea progresivă a lor în cursul diviziunii celulare şi, prin aceasta, previne senescenţa replicativă. Spre deosebire de celulele umane aflate în faze timpurii (embrionare, fetale), în celulele somatice adulte activitatea telomerazei este redusă sau absentă. Activităţi modeste ale enzimei au fost găsite în fibroblaste şi în celulele tractului gastrointestinal. Activităţi mai ridicate ale telomerazei s-au constatat în celule cu potenţial de proliferare ridicat cum sunt spermatozoizii, limfocitele activate, celulele stem. Aceste date sugerează că prin creşterea activităţii telomerazei ar fi de aşteptat prelungirea duratei de viaţă a celulelor, la limită transformându-le în celule „nemuritoare". Dar lucrurile nu stau atât de simplu deoarece nivele foarte ridicate ale activităţii acestei enzime au fost găsite în celulele canceroase, aşa cum se va arăta în detaliu în cele ce urmează. Cancerul este in esenţă multiplicarea necontrolată (nelimitată) a celulelor. Mai multă telomerază poate determina prelungirea supravieţuirii dar, în acelaşi timp, poate conduce la dezvoltarea unui cancer. Un exemplu îl constituie linia de celule „nemuritoare" **HeLa**. Aceasta derivă din materialul bioptic al unui cancer cervical prelevat în 1951 de la Henrietta Lacks care a decedat în acelaşi an. Celule din acest preparat au fost trimise (fără consimţământul bolnavei) la Johns Hopkins School of Medicine unde a fost elaborată linia HeLa folosită şi azi pentru cercetarea cancerului în laboratoare din întreaga lume. Celulele HeLa proliferează foarte rapid, mai repede decât alte tipuri de celule canceroase, ceea ce probabil contribuie la capacitatea lor de a contamina alte linii celulare folosite în cercetarea de laborator.

17.1.2.1. Boli telomerice

Gama bolilor care implică tulburări ale telomerilor şi telomerazei este largă. Diferenţele mari dintre activităţile telomerazei în diferite celule, faptul că această enzimă este activă în peste 85% din tumorile maligne, în timp ce în celulele somatice normale ea este aproape absentă, sugerează posibila utilizare a telomerazei ca marker tumoral. Un exemplu este relevant: progresia activităţii telomerazei în diferite faze ale unui proces patologic (fără a preciza tipul de malignitate) este 0,5% în celulele normale, 30% în faza preinvazivă şi 85% în faza malignă. Telomerii, în mod inexorabil se scurtează la fiecare diviziune celulară, iar eroziunea telomerilor este o consecinţă inevitabilă a îmbătrânirii. Scurtarea telomerilor poate fi şi iatrogenă; de exemplu, scurtarea telomerilor apare după transplantarea măduvei osoase în care celule stem hematopoietice înalt proliferative revigorează hematopoieza. Factorii de mediu pot şi ei să accelereze pierderea de telomeri. Eroziunea telomerilor poate fi determinată genetic; incapacitatea elongării telomerilor poate fi ereditară, ca rezultat al unor mutaţii suferite de genele care codifică componentele telomerazei. Atunci când telomerii se scurtează până la pragul critic apar capete cromozomale fără telomeri sau care sunt căpăcite neadecvat ceea ce conduce la senescenţă sau apoptoză. Dacă celula „ignoră" senescenţa şi continuă să prolifereze, de exemplu datorită stării inactive a genei *p53*, telomerii neprotejaţi pot cauza fuziunea cap-la-cap a cromozomilor, ruperea cromozomilor prin mitoză, aneuploidie, translocare, cancer. Corelate cu eroziunea telomerilor sunt mai multe boli între care **diskeratoza congenitală** (o formă de displazie ectodermică caracterizată prin triada simptomatică: unghii distrofice, piele hiperpigmentată neuniform şi leucoplachia mucoasei orale), **anemia aplastică** (asociată cu mutaţii ale genei care codifică componenta TERT a telomerazei), **fibroza pulmonară idiopatică**, boala hepatică ce apare ca rezultat al afecţiunilor menţionate mai sus şi al transplantului de măduvă.

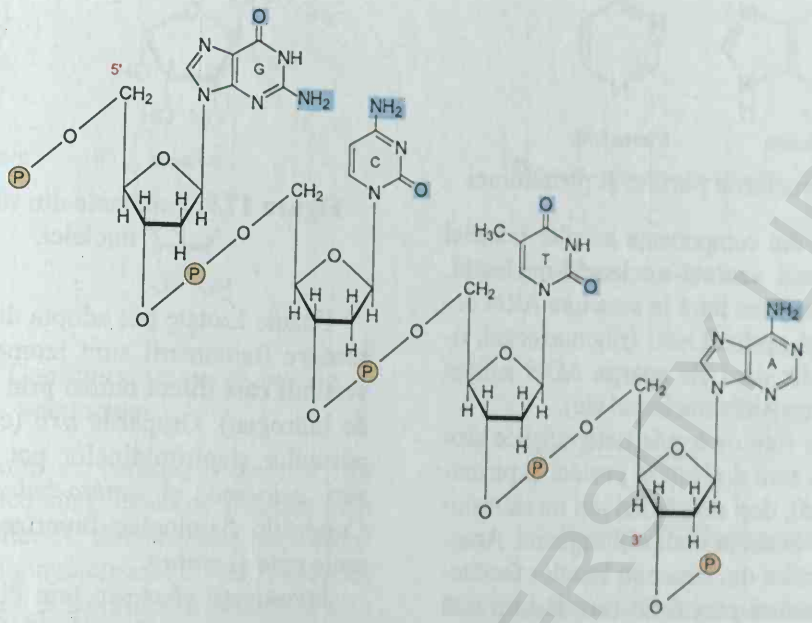


Figura 17.5. Structura primară a unui segment dintr-o catenă de ADN. Sunt marcate cu culoare albastră grupările funcţionale legate la scheletele nucleobazelor. Pentru simplitate, radicalii fosfat sunt reprezentaţi prin litera P încercuită.

Au fost raportate relaţii între eroziunea accelerată a telomerilor, inflamaţie şi cancer, un exemplu fiind observarea existenţei telomerilor scurţi în **cancerul colorectal**. Principalul factor de risc în cancerul esofagian este inflamaţia cronică de la nivelul **esofagului Barrett**. La subiecţii cu această afecţiune s-au măsurat telomerii din leucocite şi s-a găsit o proporţionalitate inversă între lungimea acestora şi riscul de cancer esofagian. S-a dedus că pierderea de telomeri contribuie la tumorigeneză şi instabilitate genetică a celulelor maligne. S-a arătat că un alt marker telomeric în unele boli inflamatorii este activitatea crescută a telomerazei. Au fost detectate activităţi scăzute ale acestei enzime în celulele normale histologic la pacienţii cu intestin gros inflamat, dar în celulele canceroase activitatea telomerazei a fost ridicată aşa cum s-a spus mai sus. Alte relaţii telomeri scurţi-cancer au implicat **carcinoamele cu celule scuamoase** ale gâtului şi capului, **cancerul anorectal** şi **leucemia mieloidă acută**. O relaţie interesantă este între lungimea telomerilor şi riscul de **infarct miocardic** şi cel de moarte la pacienţii cu **boală coronariană stabilă**.

17.1.3. Structura primară a acizilor nucleici

Revenind acum la faptul că fiecare cromatidă conţine o moleculă dublu catenară de ADN sunt prezentate în cele ce urmează structurile acizilor nucleici şi ale subunităţilor componente. Acizii nucleici depozitează informaţia genetică din celule. Principalele clase de acizi nucleici sunt acizii dezoxiribonucleici (ADN) şi acizii ribonucleici (ARN). Ei sunt alcătuiţi din **nucleotide** unite între ele în poziţiile 3' şi 5' prin legături fosfodiesterice. Nucleotidele sunt esteri fosforici în poziţia 5' a **nucleozidelor**, care, la rândul lor, sunt derivaţi N-glicozidici ai **bazelor azotate**. Grupările fosfat conferă acestor polinucleotide un caracter acid iar la pH fiziologic acizii nucleici sunt polianioni. Nucleotidul terminal al cărui atom de carbon 5' ($C^{5'}$) nu este legat la alt nucleotid se numeşte capătul 5', iar nucleotidul terminal al cărui $C^{3'}$ nu este legat de alt nucleotid se numeşte capătul 3'. Prin convenţie, secvenţa nucleotidelor dintr-un acid nucleic este scrisă începând cu capătul 5' până la capătul 3' în sensul de la stânga către dreapta. Proprietăţile unui polinucleotid cum este un acid nucleic sunt foarte diferite de proprietăţile monomerilor (nucleotide). Pe măsură ce dimensiunea polimerului creşte de la dimer la trimer, la oligomer (oligonucleotid), până la acidul nucleic, proprietăţi cum ar fi încărcătura electrică şi solubilitatea se pot modifica mult. În structura primară a ADN (*Figura 17.5*) timina înlocuieşte uracilul iar 2'-dezoxiriboza înlocuieşte riboza.

Structura secundară a ADN-ului a fost elucidată de James Watson şi Francis Crick în 1953. Structura Watson-Crick a ADN este un model pentru ceea ce înseamnă o moleculă centrală a vieţii sugerând totodată mecanismul molecular al eredităţii. O anali-

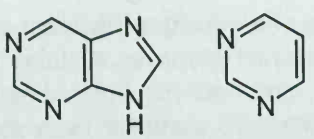


Figura 17.6. Structurile purinei şi pirimidinei.

ză a subunităţilor din componenţa acizilor nucleici relevă ierarhia **bază azotată-nucleozid-nucleotid**. Dacă aceste componente intră în structura ARN denumirile lor capătă prefixul *ribo* (ribonucleozid, ribonucleotid etc.) iar dacă ele aparţin ADN sufixul este *dezoxiribo* (dezoxiribonucleotid etc).

Bazele azotate sunt molecule heterociclice aromatice plane care sunt derivaţi ai purinei şi pirimidinei (*Figura 17.6*), deşi aceşti derivaţi nu sunt sintetizaţi *in vivo* de la aceşti compuşi organici. Aranjarea plană a atomilor din structura bazelor facilitează asocierea acestora prin forţe care stabilizează dublul-helix de ADN. Bazele care conţin gruparea $-NH_2$ sunt baze slabe având constante de stabilitate al căror exponent ia valorile $pK_b = 10–11$.

Nucleobazele azele purinice şi pirimidinice obişnuite (*Figura 17.7*) sunt **adenina** (A), **guanina** (G), **uracilul** (U), **timina** (T) şi **citozina** (C).

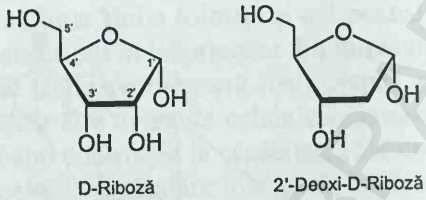


Figura 17.9. Pentozele din structura acizilor nucleici.

Bazele azotate pot adopta diferite **forme tautomere** (tautomerii sunt izomeri uşor interconvertibili care diferă numai prin poziţiile atomilor de hidrogen). Grupările *oxo* (ceto) şi *amino* ale purinelor şi pirimidinelor pot suferi tautomerizări *ceto-enol* şi *amino-imino* (*Figura 17.8*). Condiţiile fiziologice favorizează puternic formele ***ceto*** şi ***amino***.

Investigaţii efectuate prin difracţie de raze X, rezonanţă magnetică nucleară (RMN) şi spectroscopie au evidenţiat cu claritate că bazele sunt predominant în formele tautomerice *ceto* şi *amino*.

Bazele purinice formează, prin intermediul atomilor N^9 din structura lor, legături N-glicozidice cu două tipuri de pentoze (monozaharide

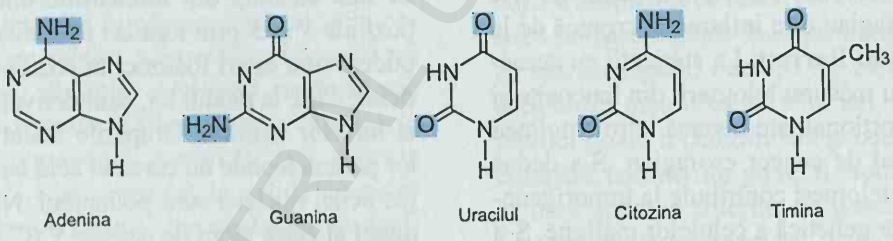


Figura 17.7. Structurile nucleobazelor purinice şi pirimidinice.

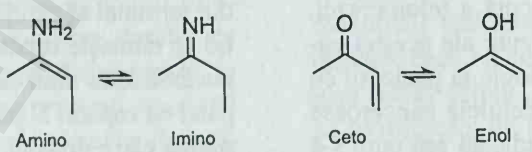


Figura 17.8. Tautomeria unor grupări funcţionale legate la scheletele nucleobazelor.

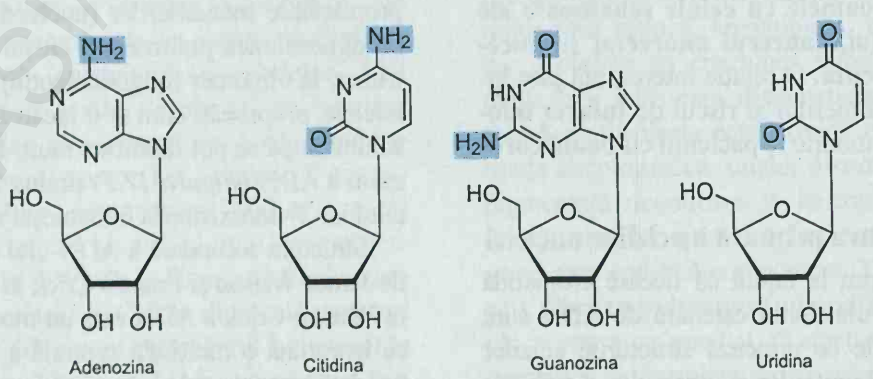


Figura 17.10. Structurile nucleozidelor purinice şi pirimidinice.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

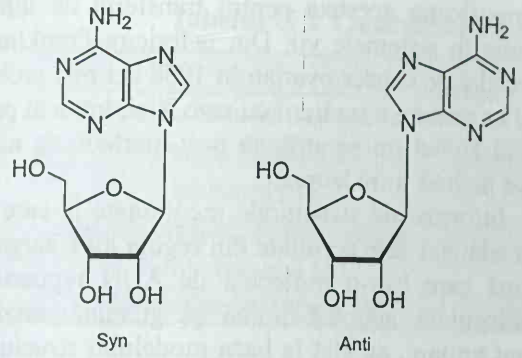


Figura 17.11. Configuraţiile *syn* şi *anti* ale adenozinei.

care conţin 5 atomi ce carbon) (*Figura 17.9*). Bazele pirimidinice sunt legate de pentoze prin intermediul atomilor N^1 din structura lor. Pentoza din structura ribonucleozidelor este **D-riboza**, iar cea din structura dezoxiribonucleozidelor este **2'-dezoxi-D-riboza**, molecula D-ribozei în care lipseşte atomul de oxigen din poziţia 2'.

Cifrele adnotate cu semnul prim (') se referă de obicei la atomi din structura zaharidelor. În *Figura 17.10* apar structurile nucleozidelor purinice şi pirimidinice.

Stânjenirea sterică creată de interacţiunile repulsive Van der Waals dintre atomii care compun heterociclurile respectiv pentozele limitează rotaţia liberă în jurul legăturii β-N-glicozidice. Ambele tipuri de nucleozide pot exista în două configuraţii care nu sunt interconvertibile (nu se pot transforma din una în alta): ***syn*** şi ***anti*** (*Figura 17.11*). Pentru a se putea transforma conformaţia *syn* în *anti* şi *viceversa* este necesară ruperea legăturii glicozidice. Ambii conformeri apar în natură, dar conformerul *anti* predomină.

Ribonucleozid 5'-monofosfaţii prezenţi în structura ARN sunt: adenozin monofosfat (**AMP**) sau acid adenilic, guanozin monofosfat (**GMP**) sau

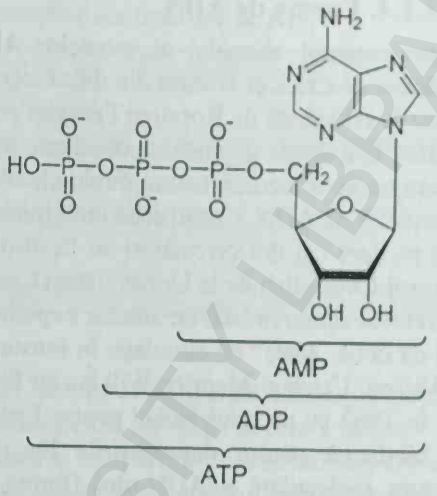


Figura 17.13. Structura ATP.

acid guanilic, citidin monofosfat (**CMP**) sau acid citidilic şi uridin monofosfat (**UMP**) sau acid uridilic. În mod similar, 2'-dezoxiribonucleotid 5'-monofosfaţii din structura ADN sunt: dezoxiadenozin monofosfat (**dAMP**) sau acid dezoxiadenilic, dezoxiguanozin monofosfat (**dGMP**) sau acid dezoxiguanilic, dezoxicitidin monofosfat (**dCMP**) sau acid dezoxicitidilic şi dezoxitimidin monofosfat (**dTMP**) sau acid dezoxitimidilic (*Figura 17.12*).

Un ribo- sau dezoxiribonucleozid poate fi esterificat la atomul $C^{5'}$ cu mono-, di- sau trianhidrida fosforică pentru a rezulta (dezoxi)ribonucleozidul mono-, di- sau trifosfat. Exemple sunt adenozin difosfat (**ADP**) şi adenozin trifosfat (**ATP**) (*Figura 17.13*). În celule, nucleotidele libere cum este ATP, GTP cunt compuşi anionici care de obicei sunt asociaţi cu contraionii Mg^{2+}. Pentru enzime, cum sunt **kinazele** care catalizează fosforilarea unor substraturi cu ajutorul nucleotidelor trifosforice, forma activă a a acestor nucleotide este cea de sare cu ionii de magneziu.

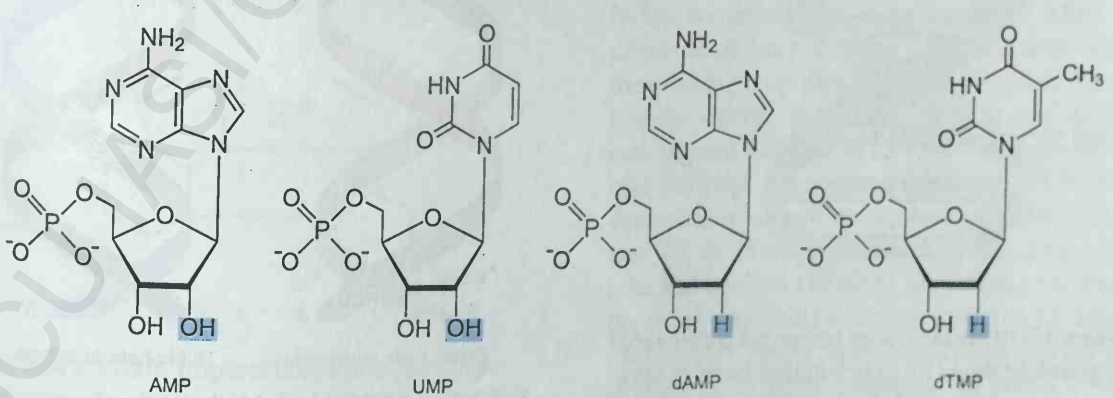


Figura 17.12. Structurile unor nucleotide monofosforice.

17.1.4. Forme de ADN

Aranjamentul elicoidal al catenelor ADN a fost dedus de Crick şi Watson din difractogramele de raze X effectuate de Rosalind Franklin pe fibre de ADN. Din datele geometrice observate în acele difractograme a rezultat natura dublu elicoidală a moleculelor de ADN. Construcţia unui model mecanic pe care cei doi cercetători au făcut-o la laboratorul Cavendish de la Universitatea Cambridge a relevat aşezarea bazelor similar treptelor unei scări cu două „piste" de circulaţie în sensuri opuse. Watson, Crick şi Maurice Wilkins au fost laureaţi în 1962 cu premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină pentru descoperirile lor privind structura moleculară a ADN-ului (forma B) şi semnificaţia acesteia pentru transferul de informaţie în sistemele vii. Din nefericire Franklin a decedat de cancer ovarian în 1958 cel mai probabil ca urmare a iradierii cu raze X şi, întrucât premiul Nobel nu se atribuie post-mortem, ea nu a fost inclusă între laureaţi.

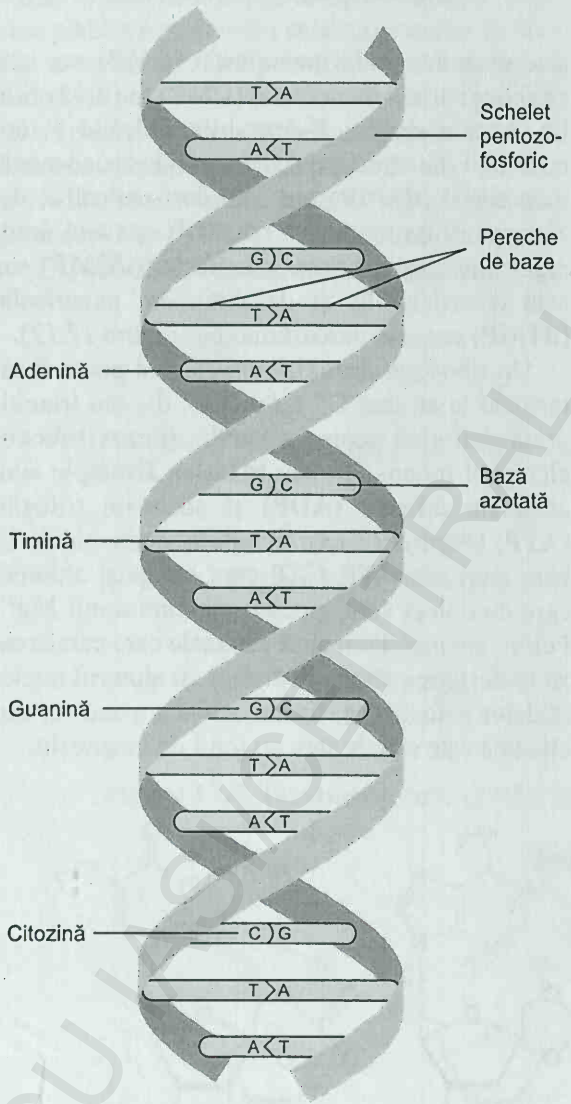


Figura 17.14. Înfăşurarea reciprocă a catenelor antiparalele de ADN şi orientarea bazelor spre interiorul duplex-ului.

Informaţiile structurale menţionate la care s-au adăugat cele rezultate din regula lui Chargaff, după care într-o moleculă de ADN rapoartele moleculare adenină-timină şi guanină-citozină sunt unitare, au stat la baza modelului structural al moleculei de ADN. Caracteristicile acestuia sunt următoarele:

- Două lanţuri polinucleotidice se înfăşoară în jurul unei axe comune pentru a forma un **dublu-helix (duplex)** *(Figura 17.14)*.
- Cele două catene ale ADN sunt **antiparalele**, fiecare din ele fiind câte un helix răsucit **la dreapta**.

Diferenţa dintre un helix la dreapta şi unul la stânga este prezentată în *Figura 17.15*. Cele două forme elicoidale ale ADN sunt în relaţie de obiect-imagine în oglindă. Geometria scheletului pentozofosforic al ADN impune orientarea răsucirii la dreapta a celor două catene elicoidale ale ADN.

- Bazele ocupă canalul interior al duplex-ului iar scheletele pentozofosforice se înfăşoară la exteriorul acestuia minimizând în acest fel stânjenirea electrică (coulombiană) creată, respingerea dintre sarcinile acestor schelete. Pe suprafaţa dublu elicoidală există adâncituri sub forma unor canale elicoidale inegale în lăţime şi adâncime. Aceste adîncituri sunt de două tipuri: **majoră** şi **minoră**.
- Bazele situate în apoziţie una faţă de cealaltă, care aparţin celor două catene elicoidale, sunt legate prin legături de hidrogen constituind

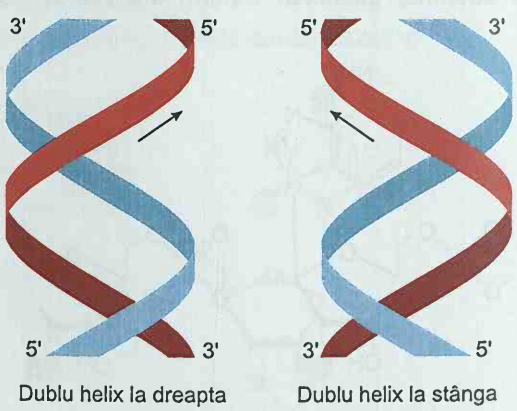


Figura 17.15. Un dublu helix la stânga este imaginea în oglindă a unui dublu helix la dreapta.

Tabelul 17.I. Caracteristici structurale şi geometrice ale tipurilor de ADN

	A	B	Z
Sensul de răsucire a catenelor	Dreapta	Dreapta	Stânga
Aspectul duplex-ului	Scurt şi gros	Lung şi subţire	Mai lung şi mai subţire
Diametru (Å)	26	20	18
Număr perechi de baze pe spiră	11	10	12
Pasul helix-ului (Å)	34	34	44
Nume fişier PDB pe CD	ADN A	ADN B	ADN Z

perechi de baze. Una din restricţiile structurale, caracteristice modelului Watson-Crick al ADN, este că acest model nu poate acomoda decât două tipuri de perechi de baze, **A-T** şi **G-C**. Altfel spus, adenina se poate împerechea numai cu timina (şi *viceversa*) şi guanina se poate împerechia numai cu citozina (şi *viceversa*) (*Figura 17.16*). Acesta este principiul împerecherii bazelor complementare sau mai pe scurt principiul complementarităţii bazelor modelului Watson-Crick al ADN. El este un rezultat al asocierii specific dintre cele două catene ale ADN.

Există 3 forme de ADN: A, B şi Z. **ADN-A** cristalizează în condiţii cu hidratare redusă şi în mod normal ea nu apare în celulă. Totuşi, ea poate fi găsită în segmentele dublu catenare ale ARN şi în timpul transcrierii, în segmentele dublu catenare hibride ADN-ARN. Atât în ADN-A cât şi în **ADN-B**, catenele elicoidale sunt răsucite la dreapta în timp ce în **ADN-Z** catenele sunt răsucite la

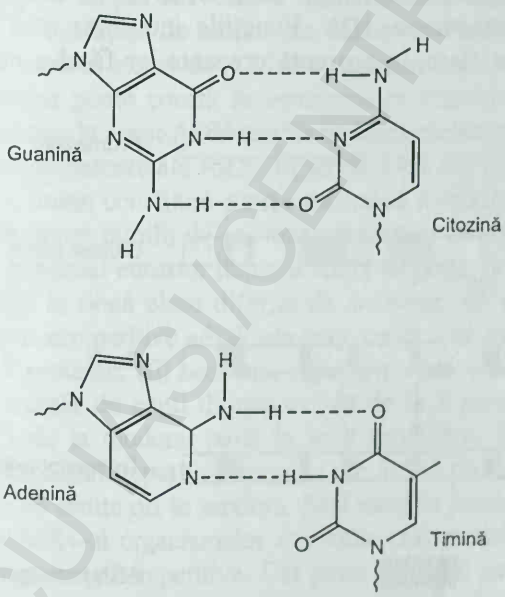


Figura 17.16. Împerecherea prin punţi de hidrogen a nucleobazelor din structura catenelor reciproc complementare de ADN

stânga. *Tabelul 17.I* prezintă câteva din principalele caracteristici ale ADN în cele 3 forme.

Există o relaţie între diametrul duplex-ului şi aspectul lui; cu cât diametrul este mai mic cu atât el este mai lung şi mai subţire. Aceste diferenţe se repercutează asupra adânciturilor minoră şi majoră. Ele sunt vizibile în imaginea [Profil] de pe CD, obţinută de autori cu interfaţa grafică Maestro. Pe de altă parte aşezarea perechilor de baze crează în duplex-ul ADN un canal axial al cărui diametru scade în ordinea A, B, Z. Imaginea în secţiune a acestor forme de ADN, existentă pe CD-ul ataşat (directorul A-B-Z), relevă diferenţele dintre diametrele canalelor. Structura de dublu helix a ADN poate conţine orice secvenţă de baze pe una din catene dacă pe catena opusă se află o secvenţă complementară de baze, astfel fiind respectată regula Chargaff. Pe de altă parte, acest model structural sugerează că fiecare catenă a duplex-ului ADN poate acţiona ca o matriţă pentru sinteza catenei complementare, adică informaţia genetică este codificată de secvenţa de baze de pe fiecare catenă. Majoritatea moleculelor de ADN sunt foarte mari (în comparaţie cu moleculele proteinelor), în conformitate cu rolul lor de depozite ale informaţiei genetice dintr-o celulă. **Genomul** unui organism, conţinutul său unic în ADN, poate fi repartizat în mai mulţi cromozomi, fiecare din cromatidele lor conţinând câte o moleculă de ADN. Este demn de menţionat faptul că majoritatea organismelor sunt de tip **diploid**, adică ele conţin două seturi echivalente de cromozomi, câte unul de la fiecare părinte. Conţinutul lor unic (**haploid**) de ADN este jumătate din conţinutul lor total de ADN. De exemplu, omul este un organism diploid care conţine 46 de cromozomi într-o celulă. Prin urmare numărul haploid (numărul de cromozomi dintr-un gamet al unui individ uman) este n = 23. Datorită lungimii lor foarte mari, moleculele de ADN sunt descrise în termenii numărului de baze (b) sau de mii de baze (kb) dintr-o catenă, semnificând numă-

rul de perechi de baze (pb) ori mii de perechi de baze (kpb) din duplex. Lungimea moleculelor de ADN poate să varieze de la ~5 kb în ADN-ul mic cum este cel conținut de virusuri până la cca. 220.000 kb ale ADN-ului celui mai mare cromozom uman, cromozomul 1. Moleculele de ADN nu sunt foarte rigide, aşa cum s-a arătat mai înainte duplex-ul formează serpentine, spirale şi bucle atunci când este împachetat în interiorul celulei. Genomul haploid uman constă din aproximativ 3 x 10^9 bp şi cca 1,7 x 10^7 nucleosomi. Prin urmare fiecare din cele 23 de cromatide ale genomului haploid uman ar conține în medie 1,3 x 10^8 nucleotide într-o moleculă de ADN dublu catenară.

17.1.5. Regiuni active şi inactive ale cromatinei

Fiecare celulă dintr-un organism animal conține aceeaşi informație genetică. Diferențele dintre diferite tipuri de celule constau în exprimarea diferențiată a informației genetice comune. Cromatina ce conține gene transcrise activ sau cu potențial de transcriere diferă de cromatina din regiunile inactive din aceste puncte de vedere. ADN-ul din cromatina activă conține regiuni (centre **hipersensibile** de 100-300 b) care sunt mai sensibile la acțiunea **nucleazei I** (DNAză I). La un nivel structural mai ridicat, structura nucleozomilor din regiunile active ale cromatinei este alterată de asocierea unor proteine nehistonice reglatoare, cu rol de **factori de transcriere,** prin care este favorizat accesul nucleazei la dublu-helix. Sensibilitatea cromatinei active la acțiunea acestei nucleaze este explicată prin lipsa de 5-metil dezoxicitidină şi ca un rezultat al unor modificări covalente ale histonelor cum ar fi fosforilarea şi acetilarea. Conținutul în 5-metil deoxicitidină al cromatinei inactive este ridicat şi histonele asociate sunt slab modificate covalent. **Eucromatina** este cromatină activă transcrisă care este mai slab împachetată. Din contră, cromatina inactivă din punct de vedere al transcrierii este strâns împachetată în timpul interfazei şi se numeşte **heterocromatină**. Există două tipuri de heterocromatină: constitutivă şi facultativă. Heterocromatina **constitutivă** este întotdeuna condensată şi, prin urmare, este inactivă. Aceasta se găseşte în vecinătatea centromerilor şi la capetele cromozomilor. Heterocromatina **facultativă** este uneori condensată şi deci inactivă din punct de vedere al transcrierii, iar alte ori se poate transcrie activ, datorită stării necondensate, comportându-se ca eucromatină.

17.1.5.1. Exoni şi introni

În genomul eucariotelor, regiunile din ADN care codifică proteine, numite exoni, alternează cu mari secvențe intermediare de ADN care nu codifică proteine, numite introni. Prin urmare, precursorii ARN mesager, prezenți în molecule numite inițial **ARN heteronuclear**, conțin secvențe intermediare necodificatoare de ARN care trebuie să fie îndepărtate printr-un proces de prelucrare post-transcriere. În cadrul acestui proces segmentele codificatoare de ARN rămase sunt sudate între ele în aceeaşi ordine în care se găseau în ARN-ul heteronuclear. Intronii sunt prezenți în mod obişnuit în structura ARN-ului heteronuclear al eucariotelor însă la procariote ei apar numai în structura ARN-ului de transport şi a ARN-ului ribozomal.

Secvențele care codifică o singură moleculă de ARN mesager sunt întrerupte în structura genomului (şi prin urmare în structura transcriptului primar) prin cel puțin una - şi în cele mai multe cazuri prin câteva zeci - de introni. În cele mai multe cazuri intronii sunt mult mai lungi decât exonii. Prelucrarea transcript-ului primar, care implică eliminarea cu precizie a intronilor, şi înădirea exonilor va fi descrisă la capitolul *Transcrierea ADN*. Funcțiile intronilor încă nu sunt clare, în aparență prezența lor fiind o mare

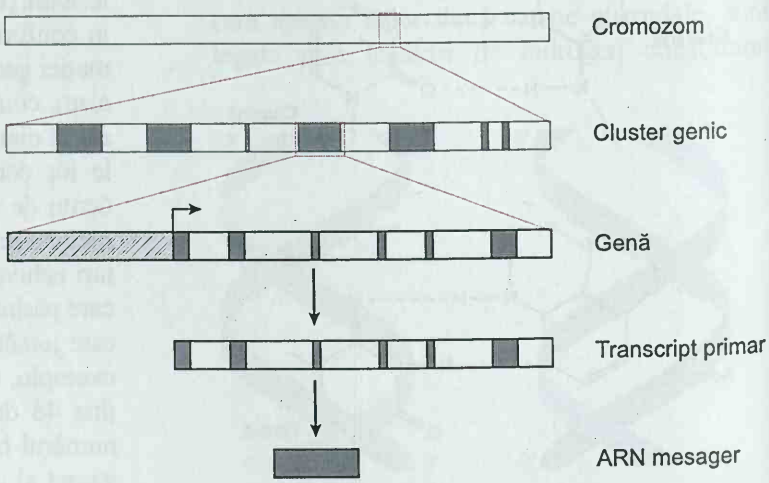


Figura 17.17. Un model al aşezării intronilor şi exonilor şi relația dintre un *cluster genic*, o genă, transcript-ul primar şi molecula de ARN mesager care codifică toate proteinele funcției genetice.

„risipă" de material genetic având în vedere că, prin prelucrarea post-transcriere, o mare cantitate din transcript-ul primar este eliminată. Totuşi, se poate constata faptul că intronii realizează separarea domeniilor funcţionale (exonii) într-o formă care să permită rearanjarea prin recombinare a materialului genetic. În acest fel este mărită accesibilitatea exonilor, adică prin separarea exonilor care codifică o funcţie genetică se obţine un acces mai rapid decât dacă aceştia ar constitui o secvenţă continuă. Genele care codifică o funcţie genetică sunt organizate pe cromozom într-un grup de gene (segmentele colorate în gri închis în *Figura 17.17*) numit **cluster**. O genă, care în medie conţine cca. 2×10^4 bp, este prevăzută la capătul 5' cu o regiune reglatoare (segmentul haşurat în gri deschis), situs-ul de iniţiere a transcrierii (săgeata frântă) fiind plasat între regiunea reglatoare şi gena propriu-zisă.

17.1.5.2. Redundanţa genomului mamiferelor

Genomul haploid al fiecărei celule umane constă din cca. 3×10^9 pb de ADN împărţit în 23 de cromozomi. Această cantitate de ADN este suficientă pentru a constitui cca. 1,5 milioane de gene cu dimensiunea medie. Totuşi, celulele umane conţin numai aproximativ 24.000 de proteine codificate, adică 1% din ADN-ul exonic al genomului. Prin urmare cea mai mare parte a ADN-ului genomului uman nu codifică proteine. O parte a excesului de ADN serveşte la reglarea exprimării genelor în timpul dezvoltării, diferenţierii şi adaptării la condiţiile de mediu ale celulelor. Participarea acestui exces de ADN la reglarea exprimării genelor poate consta în asocierea proteinelor reglatoare la acest ADN sau la codificarea segmentelor reglatoare ale ARN. În jur de 24% din genomul uman constituie partea intronică formată din mai multe familii de secvenţe repetitive de ADN. În genomul eucariot haploid ADN-ul poate fi împărţit în două clase diferite de secvenţe: (i) secvenţe nerepetitive adică secvenţe unice care codifică proteine; (ii) secvenţe repetitive care variază ca număr de copii dintr-o celulă de la 2 până la 10^7, de la moderat până la înalt repetitive. Secvenţele înalt repetitive constau din 5-500 pb repetate de multe ori în tandem. Mai mult de jumătate din ADN-ul organismelor eucariote este constituit de secvenţe nerepetitive. Cel puţin 30% din genomul uman constă în secvenţe repetitive. În funcţie de lungimea lor, secvenţele moderat repetitive sunt clasificate ca secvenţe repetitive împrăştiate lungi (LINEs = **long interspersed repeat sequences**) şi scurte (SINEs = **short interspersed repeat sequences**). Ambele tipuri pot fi **retropozoni**, adică au apărut ca rezultat al mişcării unui segment de ADN (mobil) de la un loc la altul (transpoziţie) prin intermediul unei molecule matriţă de ARN şi prin acţiunea **revers transcriptazei** care transcrie (invers) matriţa cu formare de ADN (complementar). Retropozonii se comportă asemănător cu retrovirusurile cum sunt **HIV** (Virusul imunodeficienţei umane) **şi HPV** (Virusul Papilloma uman). În genomul uman există o familie de SINEs, numită **familia Alu**, prezentă în cca. 500.000 de copii reprezentând 5-6% din genomul uman.

17.1.5.3. Secvenţe microsatelit ale ADN

O categorie de secvenţe repetitive constând în 2-6 pb care se repetă până la de 50 de ori, numite secvenţe microsatelit (sau microsateliţi) apare fie într-un aranjament grupat, fie unul împrăştiat. La oameni, cei mai frecvenţi microsateliţi sunt secvenţa repetitivă a dinucleotidului **CMP-AMP**, $(CA)_n$, de pe una din catenele ADN şi, corespunzător, secvenţa repetitivă a dinucleotidului **TMP-GMP**, $(TG)_n$, de pe catena complementară de ADN, unde *n* este numărul de repetări ale dinucleotidelor menţionate. Acest număr variază între **alele**, adică diferă de la individ la individ constituind o amprentă moleculară pentru fiecare persoană în parte, ceea ce relevă **polimorfismul** microsateliţilor. Geneticianul Alec Jeffreys, cel care a descoperit microsateliţii în 1985, a observat că aceştia sunt prelungiri ale genelor codificatoare de proteine, în cazul cercetărilor sale, gena care codifică protomerul α al hemoglobinei adulte umane. Dinucleotidul dublu catenar repetitiv $(CA/GT)_n$ apare în câteva zeci de mii de locuri în cadrul genomului uman şi variaţia numărului de repetări, n, de pe cele două cromatide relevă **heterozigozitatea** numărului de copii ale unui microsatelit particular şi aceasta are caracter ereditar. Pentru a fi identificaţi, microsateliţii pot fi amplificaţi prin tehnica **PCR** (**polymerase chain reaction**), folosind amorse adecvate. Pe scurt, ADN-ul este denaturat în mod repetat la temperatură ridicată pentru despiralizarea şi separarea catenelor duplexului ADN. Apoi sistemul este răcit pentru a permite alinierea amorselor şi alungirea secvenţelor de nucleotide ale microsateliţilor. Acest proces furnizează o cantitate de ADN suficientă pentru a fi vizibilă pe electroforetogramele obţinute în gel de agaroză sau poliacrilamidă sau

prin electroforeză capilară. Această tehnică dă posibilitatea determinării dimensiunii produsului obţinut prin amplificare, a numărului de repetări *n* ale dinucleotidului CA în fiecare alelă. Acest procedeu a căpătat importante aplicaţii în expertiza criminalistică şi în stabilirea paternităţii.

Instabilitatea microsateliţilor (MSI) este situaţia în care microsateliţii au câştigat sau au pierdut unităţi repetitive adică au suferit modificări somatice ale lungimii, ceea ce în mod frecvent se numeşte **eroare de replicare**. Având în vedere faptul că acest tip de alterare poate fi detectat numai dacă numeroase celule sunt afectate de aceaşi modificare patologică, o eroare de replicare este un indicator de expansiune clonală care este tipică unui neoplasm. Instabilitatea microsateliţilor a fost descoperită acum 11 ani ca fiind un **marker** în **cancerul colorectal nonpolipozic ereditar** (sindrom Lynch).

O formă de instabilitate a microsateliţilor care poate cauza boală este creşterea numărului de secvenţe trinucleotidice. Secvenţa repetitivă instabilă $(CGG)_n$ este asociată cu **sindromul X fragil** (numit şi sindromul Martin-Bell), ea fiind cea mai comună cauză de retardare mintală înnăscută şi cea mai cunoscută cauză de autism, a doua ca frecvenţă după sindromul Down (trisomia 21). Expansiunea microsateliţilor $(CGG)_n$ situaţi în gena *FMR1* (**fragile X mental retardation 1**) de pe braţul lung (q) al cromozomului X constă în aceea că, în timp ce la indivizii sănătoşi numărul *n* al repetărilor CGG are valoarea mediană în jur de 30, la indivizii cu sindrom X fragil *n* depăşeşte valoarea de 200. Această expansiune cauzează metilarea genei *FMR1* prin care este afectată exprimarea acestei gene, proteina retardării mintale *fragile X* (FMRP). Această proteină este exprimată în mod normal în numeroase ţesuturi, în special creier şi testicule. În creier are rol în sinaptogeneză, învăţare şi memorie ceea ce, în cazul indivizilor afectaţi de sindrom, explică spectrul larg de afectări intectuale (retardarea mintală), emoţionale şi comportamentale. Un alt efect al metilării genei *FMR1* este aspectul electrono-microscopic fragil al cromozomului X sugerată în denumirea sindromului.

O altă boală cauzată de expansiunea anormală a microsateliţilor cu trinucleotide repetitive este **corea Huntington**. Trinucleotidul repetitiv expansiv este CAG (codifică glutamina, aminoacid notat cu Q în codul monoliteral) şi aparţine genei *HTT* care codifică proteina numită **huntingtină**, exprimată în toate celulele mamiferelor, la nivele ridicate în creier (cortex, neocortex, striatum) şi testicule, şi la nivele moderate în ficat, inimă şi plămân. Această genă şi microsateliţii $(CAG)_n$ sunt localizaţi pe braţul scurt (p) al cromozomului 4. La indivizii indemni de corea Huntington *n* este mai mic de 28, iar la cei care au această boală numărul de repetări a trinucleotidului CAG depăşeşte 40. O moleculă mutantă de huntingtină (mHTT) conţine o prelungire alcătuită din *n* glutamine, notată pe scurt **poliQ**. Regiunile poliQ conferă toxicitate moleculei mHTT şi analiza bolnavilor pe grupe cu diferite grade de severitate a relevat o valoare-prag a lui *n* peste care toxicitatea mHTT creşte brusc. Astfel, până la $n = 36$ boala are o formă benignă, creşterea acestuia cu doar 2-3-4 unităţi fiind asociată cu un risc moderat. Creşterea cu 20-30 de unităţi este asociată cu un risc sever deoarece moleculele de poliQ cu catene mai lungi decat pragul de toxicitate ($n = 40$) au tendinţa să formeze atât *in vitro* cât şi *in vivo* agregate insolubile cu masă moleculară ridicată. Imaginile electrono-microscopice relevă structuri fibrilare similare cu cele rezultate prin fibrilogeneza amiloidului β în boala Alzheimer şi a proteinei prionice în scrapie. Din punct de vedere conformaţional, în boala Huntington principalul eveniment patogenetic este tranziţia poliQ de la o structură predominant buclată la una de foaie β pliată. Această tranziţie predispune la **displiere** proteică care, la rândul ei, predispune la agregarea (fibrilogeneza) mHTT. În linii mari acest mecanism este comun bolilor Huntington, Alzheimer şi Parkinson, afecţiuni neurodegenerative cronice care implică displierea unor proteine (huntingtină, β-amiloid, α-synuclein). Un filmuleţ [anim-poliQ] obţinut pe baza simulării de dinamică moleculară a poliQ cu $n >$ pragul de toxicitate este înscripţionat pe CD. Detalii privind semnificatia datelor acestei simulări apar în documentul [poliQ.doc]. **Distrofia miotonică**, **atrofia musculară spinobulbară** şi **boala Kennedy** sunt alte boli generate de instabilitatea microsateliţilor; în primul caz trinucleotidul repetitiv este CTG, iar în următoarele două acesta este CAG.

17.1.6. ADN-ul mitocondrial

Cele mai multe peptide mitocondriale (54 din 67) sunt codificate de gene nucleare. Celelalte 13 peptide sunt codificate de ADN-ul mitocondrial (**ADNmt**). Fiecare mitocondrie conţine 2-10 copii ale ADNmt. O copie de ADNmt este o mică moleculă de ADN dublu catenar circular care reprezintă cca 1% din ADN-ul celular total. Genele ADNmt codifica câteva proteine implicate în oxidarea biologică mitocondrială: unele componente ale NADH-CoQ oxido-reductazei, citocrom *c* oxidazei, citocrom *b*, ATP sintazei şi câteva molecule de ARN ribozomal mitocondrial-specifice (particulele 12S şi 16S) (*Figura 17.18*).

Moleculele de ADNmt pot fi vizualizate electrono-micoscopic după imunomarcare cu aur (*Figura 17.19,* unde bara = 0,1 μm).

În ciuda dimensiunii mici a mitocondriei mutaţiile ADNmt sunt cauze importante pentru unele boli ereditare cum sunt **neuropatia optică Leber**, o boală caracterizată de disfuncţia nervului optic care conduce la deficienţa vederii laterale, **sindromul Kearns–Sayre**, o miopatie mitocondrială care debutează înaintea vârstei de 20 de ani, **sindromul Pearson**, o boală severă care afectează măduva osoasă şi funcţiile pancreasului şi **sindromul Leigh**, o boală care afectează sistemul nervos central (SNC) fiind caracterizată de defecte ale fosforilării oxidative mitocondriale. O caracteristică importantă a ADNmt este că se moşteneşte doar pe linie maternă şi prin urmare se transmite doar pe cale ereditară

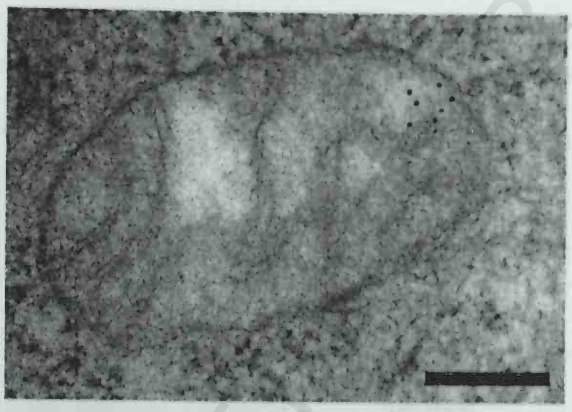


Figura 17.19. Secţiune citoplasmatică obţinută după imunomarcare cu aur folosind anticorpi anti-ADN. Particulele de aur se găsesc aproape de membrana mitocondrială (prin bunăvoinţa prof. Peter Cook de la Universitatea Oxford).

maternă nemendeliană. O mamă afectată de o boală mitocondrială poate transmite boala tuturor copiilor săi, dar numai fetele sale transmit defectul genetic.

17.1.7. Recombinarea cromozomală

Materialul genetic poate fi alterat însă există o cale prin care el să fie rearanjat: recombinarea cromozomală. Procesul de recombinare implică ruperea şi re-legarea cromozomilor parentali (M = mascul; F = femelă) pentru a rezulta cromozomi (C1, C2) care conţin ADN de la ambii părinţi (*Figura 17.20*). Acest fenomen, a fost ilustrat în 1916 de Thomas Hunt Morgan.

Informaţia genetică poate fi schimbată între cromozomi similari sau omologi. Recombinarea cromozomilor omologi apare în primul rând în timpul meiozei, un tip reducţional de diviziune celulară care necesită alinierea cu precizie a lor şi prin care se produc **gameţii** (ovule şi spermatozoizi) prin diminuarea materialului genetic, fază caracteristică tuturor organismelor (inclusiv cele monocelulare) care se reproduc sexual. Un alt tip de diviziune celulară, mitoza, produce **celule somatice**. Transferul unor segmente oligonucleotidice dintre două molecule de ADN se numeşte **încrucişare cromozomală** (în terminologia engleză **crossingover** sau **crossover**) şi el poate juca un rol important în procesele de reparare a ADN.

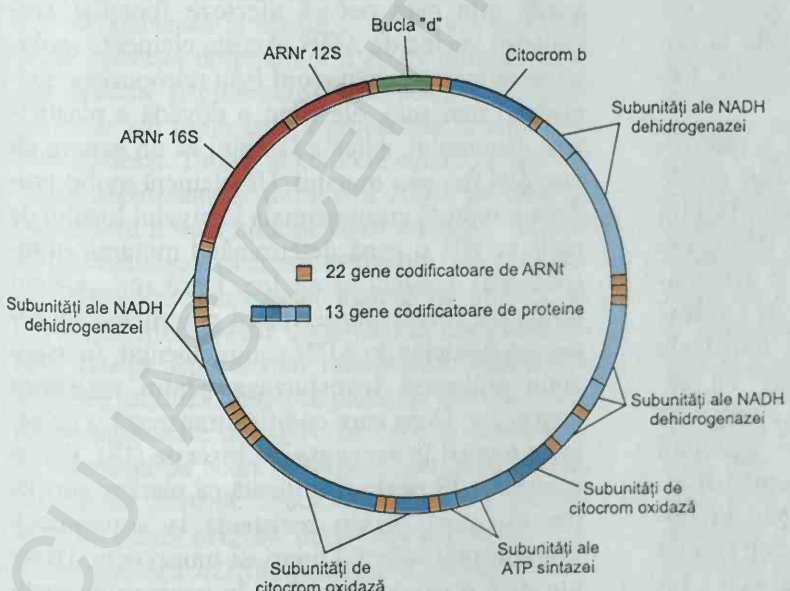


Figura 17.18. Segmentele ADNmt codificatoare de proteine (enzime) şi ARN ribozomal

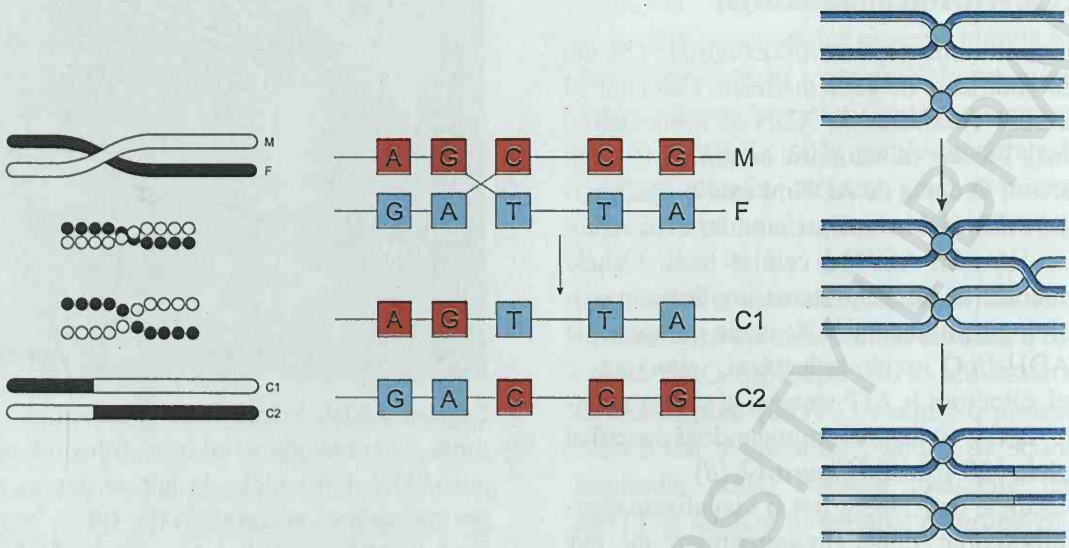


Figura 17.20. Prezentări schematice ale recombinării cromozomale. Stânga: figura imaginată de T. H. Morgan. Elementele colorate în negru aparţin unei cromatide, cele necolorate aparţin cromatidei "surori". Mijloc: o schemă care detaliază cromatidele înfăţişând nucleotidele prin pătrate colorate în funcţie de cromatida căreia îi aparţin. Dreapta: o ilustrare actualizată a recombinării cromozomilor omologi.

Recombinarea determină între cromozomii omologi un schimb egal şi reciproc de informaţie genetică. Dacă aceşti cromozomi posedă alele diferite ale aceloraşi gene, încrucişarea poate produce diferenţe notabile în caracterele ereditare. În cazul rar întâlnit în care aliniamentul cromozomilor omologi nu este exact **recombinarea inegală** a lor poate determina un schimb inegal de informaţie genetică, adică un partener al perechii de cromozomi poate primi mai puţin material genetic suferind o **deleţie**, în timp ce celălalt partener de crossover primeşte mai mult material genetic suferind o **inserţie**. Recombinarea inegală la om este dovedită prin existenţa hemoglobinelor **Lepore** şi **anti-Lepore**.

Unii bacteriofagi sunt capabili să sufere recombinare cu ADN-ul bacteriei gazdă pe o cale prin care informaţia genetică a bacteriofagului este încorporată prin inserţie liniară în informaţia genetică a gazdei. Scheletul circular al genomului bacteriofagian este clivat şi la fel este clivat şi ADN-ul bacterian iar apoi capetele libere ale acestor molecule de ADN sunt „sudate" cu respectarea polarităţii lor. Şi aceasta este o formă de recombinare genetică. Locul în care genomul bacteriofagului este integrat sau recombinat cu genomul bacterian este selectat prin unul din două mecanisme. Unul din mecanisme este similar recombinării cromozomilor omologi şi este folosit atunci când bacteriofagul conţine o secvenţă de ADN omoloagă cu o secvenţă din molecula de ADN bacterian. Totuşi, unii bacteriofagi sintetizează proteine care conectează „centre specifice" de pe cromozomul bacterian la un „centru" neomolog caracteristic al moleculei de ADN bacteriofagic. În acest caz intergrarea se spune că este „centru-dependentă".

17.1.7.1. Transpozoni

În celulele eucariote mici segmente de ADN, care nu sunt virusuri, pot suferi **transpoziţie** (transpunere) în interiorul şi în afara genomului-gazdă prin care pot să afecteze funcţiile secvenţelor vecine de ADN. Aceste elemente mobile, se numesc **transpozoni** (sau retropozoni, menţionaţi mai sus), ele fiind o dovadă a plasticităţii genomului, adică a faptului că un genom nu este nici fix, nici imuabil. Un element mobil produce o ruptură cromozomală la nivelul locului de unde se află o genă determinând mutarea (transpunerea) acesteia în alt loc. Dacă retropozonii utilizează revers transcriptaza pentru transpunerea segmentelor de ADN complementar, transpozonii utilizează **transpozaza** pentru realizarea mişcărilor. Gena care codifică transpozaza se găseşte tocmai în **secvenţa de inserţie** (IS). Partea centrală a IS poate fi utilizată ca marker genetic (de ex. gena pentru rezistenţă la antibiotice). Transpozonii suferă 2 tipuri de transpoziţii: (i) replicativă şi (ii) conservativă. În transpoziţia replicativă transpozonul original se copiază prin replicare, rămânând la locul lui, iar copia se inseră în

segmentul cromozomal-ţintă (**copy-paste**). În transpoziţia conservativă transpozonul însuşi se mută în segmentul cromozomal-ţintă (**cut-paste**). Familia Alu, menţionată mai sus, are caracteristici structurale similare unor regiuni din structura retrovirusurilor ceea ce explică capacitatea acestora de a se mişca în interiorul şi în afara genomului mamiferelor. Se poate spune că prin transpoziţie are loc recombinarea genetică deşi nu se produce un schimb de material genetic. Fenomenul a fost descoperit de în 1948 de Barbara McClintock, răsplătită în 1983 cu Premiul Nobel.

17.2. Replicarea ADN

Pentru a furniza urmaşilor informaţia genetică deţinută de părinţi, replicarea ADN trebuie să fie completă şi realizată astfel încât să asigure stabilitatea genetică a urmaşilor şi speciei. Aproximativ 30 de proteine sunt implicate în replicarea cromozomului de *Escherichia coli* şi acest proces este mai complex la organismele eucariote.

ADN polimeraza I (**Pol I**), descoperită de Arthur Kornberg în 1956, care la *E. coli* este produsul genei *polA*, are multiple activităţi enzimatice şi necesită ca substraturi cele 4 dezoxiribonucleozide trifosforice (dATP, dGTP, dCTP şi dTTP). Activităţile Pol I sunt direcţionale datorită polarităţii moleculei de ADN: (i) polimerază în sensul 5' → 3' (înainte), pentru care necesită un punct de sprijin reprezentat de capătul 3' al unei **amorse** de tip ARN (numită **primer** în terminologia engleză); (ii) exonuclează în sensul 3' → 5' (înapoi) care mediază funcţia corectoare a Pol I; (iii) exonuclează în sensul 5' → 3' prin care mediază operaţia de reparare a ADN numită **nick-translation** şi eliminarea amorselor. Principiile generale ale replicării la procariote şi eucariote sunt aceleaşi. Totuşi, la celulele eucariote apare o etapă suplimentară: duplex-ul ADN pe care în continuare îl vom nota pe scurt **ADNdc**, trebuie să reconstituie structura cromatinei, inclusiv nucleozomii care au existat înainte de intrarea în replicare. Mecanismul replicării la eucariote relevă câteva aspecte mai importante. Replicarea se poate produce numai în prezenţa unei molecule monocatenare de ADN, pe care în continuare o vom nota pe scurt **ADNmc**, care îndeplineşte funcţia de matriţă. Procesul începe cu găsirea unui loc numit **origine**, după care se produc:

- despiralarea ADNdc pentru a fi eliberate catenele matriţă separate,
- formarea **bifurcaţiei de replicare**,
- sinteza amorsei ARN,
- iniţierea sintezei catenei *fiică* şi elongarea acesteia,
- formarea „ochiurilor" de replicare şi sudarea unor fragmente de ADN *fiică* numite **fragmente Okazaki**,
- refacerea ADNdc prin împerecherea unei catene **fiice** cu o catenă matriţă şi
- reconstituirea structurii cromatinei.

În procesul replicării sunt implicate mai multe proteine: ADN polimeraze, helicaze (despiralează ADN-ul), topoizomeraze (reducerea tensiunii torsionale), primaze (sinteza amorselor ARN), proteine de legare de ADNmc (**single strand binding proteins** = **SSBPs**) care împiedică realinierea/spiralarea ADNdc, ligaza (sudarea fragmentelor Okazaki în catena *fiică*). Bifurcaţia replicării face ca sinteza ADN-ului să se realizeze prin mecanisme diferite, în funcţie de polaritatea catenei matriţă: unul în care sinteza este continuă utilizând catena de ADN numită „leading strand" pe care o vom numi catena ***directă*** şi un altul prin care sinteza are loc discontinuu utilizând catena numită „lagging strand" pe care vom numi catena ***retrogradă***. La aceste diferenţe contribuie şi faptul că noile catene de ADN sunt sintetizate întotdeauna în direcţia 5' → 3' deoarece ADN polimerazele sunt capabile să ataşeze un nucleotid numai la capătul 3' al ADNmc.

17.2.1. Originile de replicare

Pentru iniţierea replicării la originea ei (*ori*) intră în acţiune proteine de asociere la ADNdc cu specificitate pentru secvenţă, care se leagă la unele secvenţe repetitive ale ADN. De exemplu, în bacteriofagul λ, la nivelul originii ***oriλ*** se asociază **proteina O λ-codificată** iar în *E. coli* la nivelul originii ***oriC*** se asociază o proteină care este produsul genei ***dnaA***. O proteină din cele menţionate se autoasociază pentru a forma un multimer şi apoi prin asocierea acestuia la o secvenţă de ADNdc este indusă denaturarea locală şi despiralarea unei secvenţe vecine de ADN bogată în perechi A-T. În celulele de levuri o secvenţă de replicare autonomă (**autonomously replicating sequence** = **ARS** sau **replicator**) joacă rolul unei origini (*ori*). De fapt componenta din ARS, care joacă rolul originii propriu-zise, este o secvenţă modificată conformaţional (**origin replication element** = **ORE**), localizată în vecinătatea unei secvenţe bogate în perechi A-T care se despiralează. La ORE se asociază un set de pro-

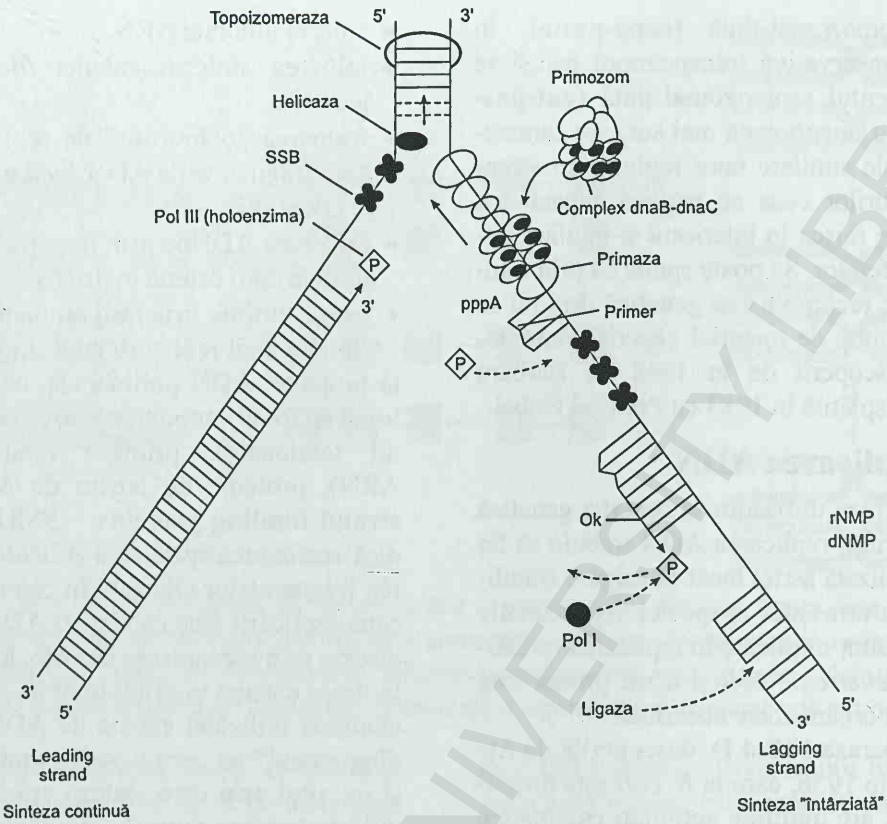


Figura 17.21. Reprezentarea schematică a mecanismelor replicării la procariote pe cele două catene matriță, *directă* (leading strand) şi *retrogradă* (lagging strand). Un fragment Okazaki este simbolizat cu prefixul Ok. Celelalte explicații sunt în text.

teine ca şi în cazul originilor *oriλ* şi *oriC* care asociază proteinele O λ-codificată respectiv dnaA. Această secvență se numeşte element de despiralare a ADN (**DNA unwinding element** = **DUE**). DUE este origine a replicării la drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) şi la ea este asociat hexamerul proteinei **MCM** (**mini-chromosome maintenance**). Setul de proteine care recunoaşte ORE se numeşte complexul pentru recunoaşterea originii (**origin recognition complex** = **ORC**). Acesta se asociază la nivelul originilor replicării cromozomilor. ORC omologi au fost găsiți la toate celulele eucariote. În drojdie asocierea ORC la ADN este stimulată de ATP.

17.2.1.1. Despiralarea secvenței bogate în A-T

Punctul „start" al replicării este creat de interacțiunea proteinelor cu *ori*, ceea ce pregăteşte un scurt domeniu al ADNmc specific pentru inițierea sintezei ADN. Despiralarea progresivă a ADN-ului bacterian este determinată de un complex al enzimei **helicaza** (produs al genei *dnaB*), cu o proteină (produs al genei *dnaC*) având funcția de reglator negativ al helicazei, la care se adaugă SSBPs care stabilizează acest complex. Disocierea reglatorului din complexul cu helicaza, sub acțiunea unei **proteine inițiatoare** (*dnaA*), activează această enzimă care, cu consum de ATP, provoacă despiralarea ADNdc. În aceste condiții, helicaza se asociază cu **primaza** (*dnaG*) activând-o să sintetizeze amorse de tip ARN pe catena *retrogradă*. Capetele 3' ale amorselor sunt puncte de pornire ale sintezei fragmentelor Okazaki sub acțiunea catalitică a ADN polimerazei III (Pol III) bacteriene. Pol III a fost descoperită în 1970 de Thomas Kornberg (fiul lui Arthur Kornberg).

Dacă *E. coli* este infectată cu fagul λ complexul P/dnaB, care implică proteina fagică P, interacționează cu proteina O λ-codificată iar complexul P/dnaB/O se asociază la *oriλ*. Interacțiunea complexului P/dnaB cu proteina O λ-codificată este o condiție a asocierii complexului de *oriλ*. În acest complex helicaza nu este activă. Însă, în *E. coli* există câteva **proteine de şoc termic** (**heat-shock protein** = Hsp sau chaperone) care cooperează pentru a îndepărta proteina P din complex; prin aceasta este activată helicaza şi

Tabelul 17.II. Diferite polimeraze şi funcţiile lor la *E. coli* şi organismele eucariote.

E. coli	Eucariote	Funcţie
Pol I		Sinteza ADN, umplerea golurilor create prin replicare pe catena *retrogradă*, reparare şi recombinare
Pol II		Corectarea şi repararea ADN
	Pol β	Repararea ADN
	Pol γ	Sinteza ADN mitocondrial
Pol III	Pol ε	Sinteza eficientă a ADN pe catenele *directă* şi *retrogradă*, reparare
Primaza (*dnaG*)	Pol α	Sinteza amorselor
	Pol δ	Sinteza eficientă a ADN pe catena *retrogradă*

este promovată replicarea fagului λ, după despiralarea ADN ajutată de SSBPs. Aceste chaperone sunt Hsp70 (*dnaK*), proteină cu masa 70 kDa, care este ajutată de co-chaperona Hsp40 (*dnaJ*) şi factorul de schimb al nucleotidelor (GrpE) care promovează conversia formei ADP a Hsp70 în forma ATP a acesteia. În concluzie, replicarea bacteriofagului λ este realizată cu preţul replicării bacteriei-gazdă *E. coli*.

17.2.2. Bifurcaţia de replicare

Formarea bifurcaţiei de replicare constă într-o secvenţă de evenimente care pot fi intuite privind *Figura 17.21*: (i) helicaza despiralează un segment scurt de ADN matriţă; (ii) primaza iniţiază sinteza unei amorse de tip ARN necesar pregătirii sintezei ADN; (iii) polimeraza iniţiază sinteza catenei de ADN *fiică*; (iv) SSBPs se asociază la ADNmc pentru a împiedica realinierea/ spiralarea catenelor matriţă şi *fiică*.

Polimeraza III (Pol III), enzimă care în *E. coli* este produsul genei *dnaE*, se asociază la ADN-ul matriţă care face parte dintr-un complex în care se mai află câţiva factori (β, γ, δ, δ' şi τ), neprecizaţi în figura 21. Această polimerază funcţionează diferenţiat în funcţie de matriţă. Pe catena *directă*, catena *fiică* este sintetizată în mod continuu iar pe catena *retrogradă* sinteza se petrece cu intermitenţă rezultând fragmente Okazaki de 1-5 kb. În eucariote aceste fragmente au lungimi de 100 – 200 de ribonucleotide. Pol III sintetizează pe catena *retrogradă* până la o mie de fragmente Okazaki pe fiecare bifurcaţie de replicare, cu concursul helicazei care despiralează ADNdc pentru a permite accesul primazei la catena matriţă. În cadrul acestor acţiuni cele două enzime, helicaza şi primaza, sunt asociate între ele. Primaza catalizează sinteza amorselor care constituie „punctele de sprijin" folosite de polimerază pentru pornirea sintezei ADN, în lipsa lor polimeraza nu poate iniţia sinteza *de novo* a catenei *fiică* pe matriţa constituită de catena *retrogradă*. **Primozomul** este un complex ale cărui principale componente enzimatice sunt helicaza şi primaza. În alcătuirea acestui complex mai intră proteina reglatoare a helicazei (*dnaC*) precum şi câteva proteine exprimate de genele *dnaT*, *priA*, *priB* şi *priC*. Componentele primozomilor din *E. coli* (expresiile genelor *priA*, *priB*, *priC*, *dnaT*, *dnaB*, *dnaC* şi *dnaG*) au fost confirmate prin experimente reconstitutive *in vitro* în care modelul experimental a fost bacteriofagul ΦX174. După terminarea sintezei unui fragment Okazaki, Pol III este eliberată şi începe sinteza următorului fragment ş.a.m.d.

17.2.3. Polimerazele

Toate polimerazele cunoscute realizează 3 acţiuni importante:

- elongarea catenei de ADN,
- procesarea ei,
- corectarea ei.

În *E. coli* există 3 ADN polimeraze (I, II şi III) iar în celulele eucariote există 4 polimeraze (β, γ, δ şi ε), primaza eucariotă fiind Pol α (*Tabelul 17.II*). Toate aceste polimeraze fac parte din clasa **ADN polimerazelor ADN-dependente.** Dintre cele 3 polimeraze bacteriene cea mai eficientă este Pol III. Acţiunea ei începe după separarea catenelor matriţă de la nivelul originii replicării fiind capabilă să realizeze polimerizarea a cca. 500 kb/ciclu atunci când utilizează catena *directă* ca matriţă. Eficacitatea ridicată a enzimei se bazează pe stabilitatea mare a complexului Pol III – ADN şi pe viteza mare cu care noua catenă de ADN este elongată. Un rol în creşterea eficienţei cu care acţionează Pol III îl au 2 subunităţi β identice din structura unui complex, numit **replizom**, al cărui principal component este dimerul format din mo-

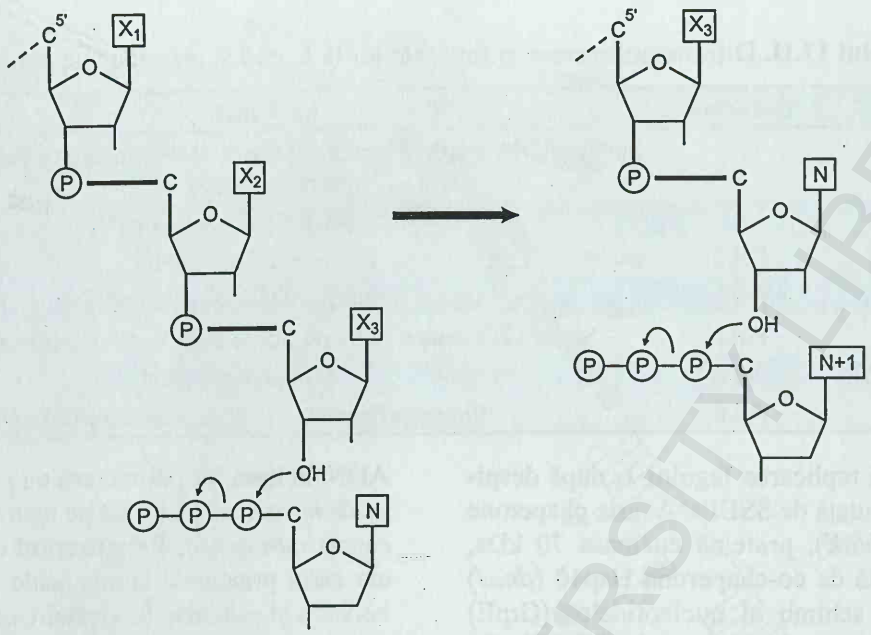


Figura 17.22. Mecanismul chimic al debutului replicării având ca punct de sprijin capătul 3' al amorsei ARN şi elongarea catenei fiică.

lecule de Pol III. Subunităţile β acţionează ca o clemă alunecătoare de-a lungul catenei matriţă. În absenţa lor „miezul" polimerazei s-ar desprinde de catena matriţă imediat după ce s-a sintezat un polinucleotid format din 10-50 subunităţi, adică dupa cca. o secundă de funcţionare. În alcătuirea replizomului intră:

- o subunitate α care are activitate polimerazică,
- o subunitate ε care are activitatea „corectoare" a „greşelilor" de polimerizare,
- o subunitate θ care stimulează activitatea subunităţii ε,

Acestea constituie "miezul" Pol III. Se adaugă celelalte subunităţi ale replizomului, şi anume:

- cele două subunităţi β menţionate,
- două subunităţi τ care stabilizează dimerul Pol III şi
- o subunitate γ care ajută subunităţile β.

Pol I şi Pol II sunt implicate în special în umplerea golurilor din catena ADN rezultate prin replicarea ADN pe catena *retrogradă* ca matriţă, în corectarea şi repararea ADN.

17.2.4. Sinteza ADN

Aşa cum se vede în *Tabelul 17.II*, în *E. coli* sinteza amorselor ARN este catalizată de primază, iar la eucariote de polimeraza α (Pol α). Lungimile acestor amorse variază între 10 şi 200 de nucleotide. Condensarea primului dezoxiribonucleozid trifosfat (dNTP cu baza N) prin atacul nucleofil al atomului de oxigen de la capătul 3' al amorsei asupra grupării fosfat α din nucleotidul reactant, cu scindarea pirofosfatului, este prezentată în *Figura 17.22*. Această reacţie, având ca matriţă catena *directă,* este catalizată de Pol III la *E. coli* şi Pol ε la eucariote. În partea dreaptă a acestei figuri este prezentată elongarea catenei de ADN *fiică* prin ataşarea celui de al doilea nucleotid. Aceasta este realizată prin acelaşi mecanism: gruparea 3'-OH a nucleotidului N, ataşat anterior, atacă nucleofil următorul dezoxiribonucleozid trifosfat (dNTP cu baza N + 1).

Atacarea dezoxiribonucleozid trifosfaţilor adecvaţi este dictată de principiul complementarităţii bazelor enunţat de Watson şi Crick: în dreptul adeninei din subunitatea matriţă dAMP va pătrunde molecula de dTTP pentru a alungi catena fiică de ADNmc, în dreptul citozinei va pătrunde dGTP ş.a.m.d. Acelaşi principiu funcţionează şi la ataşarea ribonucleozid trifosfaţilor pentru sinteza amorselor: în dreptul timinei matriţă pătrunde ATP, în dreptul citozinei va pătrunde GTP ş.a.m.d. (*Figura 17.23*).

La mamifere, după ce fragmentele Okazaki au fost generate, replizomul începe să elimine amorsele nucleotid cu nucleotid sub acţiunea catalitică a activităţii exonucleazice (5' → 3') a Pol I, golurile rămase fiind umplute cu dezoxinucleotidele adecvate principiului Watson-Crick, sub acţiunea polimerazică (5' → 3') a Pol I (**nick-translation**). Apoi, sudarea fragmentelor de

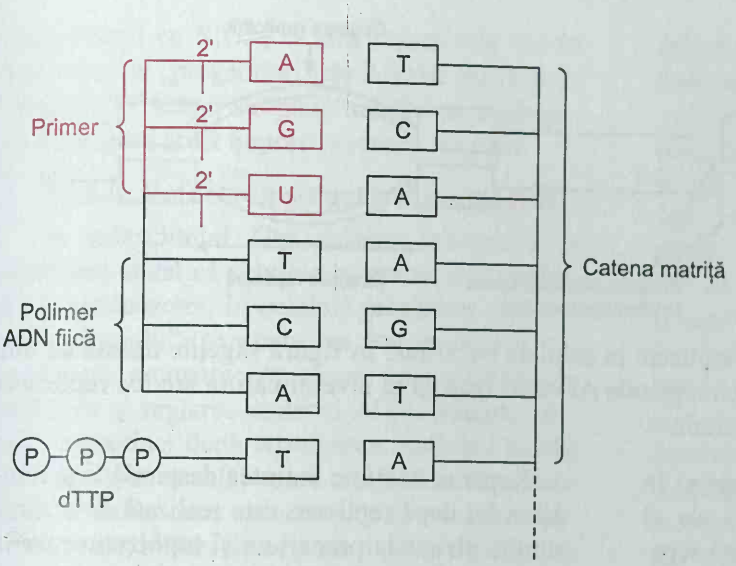


Figura 17.23. Modul în care sunt împerecheate moleculele amorsă şi fragmentele Okazaki pe deoparte cu catena matriță pe de altă parte.

ADN nou-sintetizate, adică condensarea grupărilor hidroxil din poziția 3' a dezoxiribozei cu grupările fosfat libere, este efectuată sub acțiunea catalitică a enzimelor numite **ADN ligaze**. Întrucât nu există o enzimă cu activitate polimerazică în **direcția de sinteză** 3' → 5' a catenei *fiice*, nu este posibilă sinteza simultană a catenelor *fiice* de ADN în aceeaşi **direcție globală**. Direcția globală este direcția de deplasare a bifurcației de replicare. Totuşi, s-a dovedit că Pol III poate replica ambele catene matriță în acelaşi timp. Acest fapt se explică astfel: Pol III replică catena *directă* în direcția de sinteză 5' → 3' în mod continuu, direcția pe catena matriță fiind 3' → 5' aşa cum se întâmplă în mod obişnuit, aceeaşi cu direcția de deplasare a bifurcației. Aşa cum este de aşteptat, catena *retrogradă* este replicată tot pe direcția 5' → 3', aceasta fiind opusă direcției de deplasare a bifurcației. Din această cauză replicarea pe *catena retrogradă* nu se poate face în mod continuu ci cu intermitență, ea constând în sinteza unor segmente scurte, fragmentele Okazaki. Comparând acum strategiile de sinteză a ADN pe cele 2 catene matriță este de remarcat că în timp ce pe catena *directă* este necesară o singură amorsă pentru a se sintetiza întreaga catenă *fiică*, pe catena *retrogradă* sinteza catenei *fiică* se face cu participarea unui mare număr de amorse. Sinteza amorselor în prelungirea cărora se dezvoltă fragmentele Okazaki are loc după formarea unei bucle a catenei retrograde care asigură ca direcția de creştere a fragmentelor nou-sintetizate de ADN să coincidă cu direcția de deplasare a bifurcației. Dezvoltarea unui fragment de ADN pe această matriță este orientată către capătul liber al amorsei precedente ceea ce permite derularea procesului de **nick-translation**. În acest fel, pe catena *retrogradă* are loc sinteza **semi-discontinuă** a ADN. Imagini sugestive ale mecanismului replicării sunt cuprinse într-un filmuleț de animație, numit [anim-replicare] şi un altul, interactiv, care prezintă mai detaliat acelaşi proces, filmuleț numit [anim-replic].

17.2.5. „Ochiurile" de replicare

Bacteriile conțin o singură moleculă circulară de ADNdc şi, la nivelul acesteia, o singură origine a replicării. Segmentul de ADN care este copiat pornind de la origine se numeşte **replicon** (a nu se confunda cu replizomul). În *E. coli* repliconul unui cromozom circular conține 4,6 Mpb şi are nevoie de cca. 30 de minute pentru a duce până la capăt replicarea. Înseamnă că viteza de replicare a acestui organism este de cca 300 kb/min. Presupunând că genomul unui mamifer (3,2 Gpb) este replicat cu aceeaşi viteză pornind de la o singură origine (*ori*) timpul necesar replicarii întregului genom ar fi de cca. 180 de ore. În realitate, replicarea unui genom de mamifer durează cca. 9 ore. Această reducere substanțială a timpului de replicare este realizată pe două căi:

- replicarea este **bidirecțională**, adică ambele catene matriță sunt replicate simultan,
- replicarea are loc pornind de la *ori* **multiple.**

Aceste strategii determină apariția ochiurilor de replicare (*Figura 17.24*). Celulele eucariote conțin multiple origini de replicare şi, prin urmare, la un moment dat pe cromozomul liniar există mai multe ochiuri.

În prezent se ştie că inițierea replicării este reglată spațial şi temporal (există situs-uri grupate care funcționează ca nişte declanşatoare sincrone). „Aprinderea" replicării la o *ori* depinde de structura cromatinei: în cursul fazei S, perioadă a ciclului celular când are loc replicarea, există mulți replicatori şi un exces de ORC.

O descriere comparativă a replicării la procariote şi eucariote relevă următorele aspecte. Ca

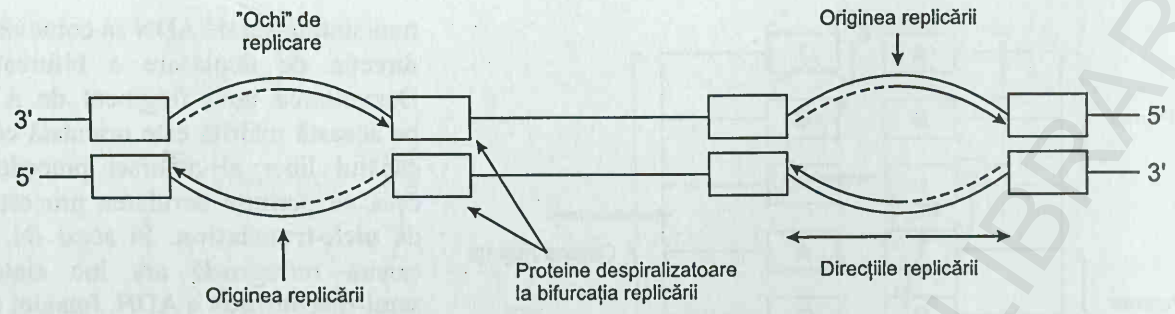


Figura 17.24. Formarea „ochiurilor" de replicare în celulele eucariote. În figură săgeţile trasate cu linii pline, plasate în ochiurile replicării, indică regiunile ADNmc matriţă la nivelul cărora are loc replicarea ceea ce evidenţiază bidirecţionalitatea acesteia.

să fie replicat, ADNdc trebuie să fie separat în catenele *directă* şi *retrogradă* pentru ca ele să poată servi ca matriţe de replicare. Această separare poate fi descompusă în două evenimente:

- despiralarea a câte 10 perechi de nucleotide aparţinând unor segmente din ochiurile de replicare. Hexamerul **proteinei β-ADN** despiralează ADN-ul în E. *coli*. Acest hexamer conţine o subunitate α care joacă unei „balamale" a cărei basculare cu un unghi de 12° „împinge" ADNmc să gliseze prin canalul hexamerului cu cca. 0,5 nm [Hexamer]. Hexamerul proteinei MCM despiralează ADN-ul în celulele eucariote cum sunt cele de *Saccharomyces cerevisiae* [1LTL];
- ruperea legăturilor de hidrogen dintre baze. Separarea catenelor de ADNmc şi menţinerea acestora separate una de cealaltă, pe măsură ce bifurcaţia de replicare avansează, este realizată de SSBPs în *E. coli* şi de proteina A a replicării (RPA) în celulele eucariote. Asocierea acestor proteine stabilizatoare nu afectează funcţia de matriţă a ADNmc şi este cooperativă şi stoichiometrică.

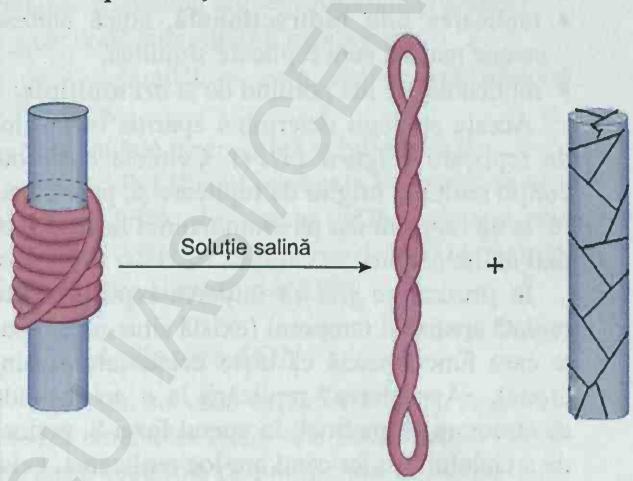


Figura 17.25. Tranziţia care se petrece atunci când nucleozomii sunt dezagregaţi prin extracţia histonelor din cromatină cu soluţie salină concentrată.

Ruperea ADNmc înaintea despiralării şi resudarea lui după replicare este realizată de enzime numite **giraze** la procariote şi **topoizomeraze** la eucariote. O altă funcţie importantă a acestor enzime este reglarea supraînfăşurării ADNdc. ADN-ul supraînfăşurat este o moleculă înaltstructurată. *Figura 17.25* prezintă un model topologic al tranziţiei de la o stare supraînfăşurată la una mai slab înfăşurată.

Există 4 tipuri de topoizomeraze. Topoizomerazele de tip I modifică gradul de supraînfăşurare al ADN în timp ce topoizomerazele de tip II (de exemplu giraza bacteriană) cauzează o crestătură în ADNdc prin ruperea uneia din catene cu câteva spire *în amonte* de bifurcaţie care să permită despiralarea segmentului de ADNmc dintre crestătură şi bifurcaţie. Această strategie reduce mult energia (ATP) necesară despiralării, mult mai mică pentru desprinderea câtorva spire din catena secţionată de segmentul complementar din cealaltă catenă decât pentru dezrăsucirea întregii molecule de ADNdc. Re-sudarea catenei secţionate este catalizată de o **ligază**. Topoizomeraza III este implicată în reglarea recombinării ADN iar topoizomeraza IV participă la procesul de segregare a cromozomilor nou replicaţi.

Virusurile ARN (retrovirusuri) conţin o clasă de enzime numite **ADN-polimeraze ARN-dependente** sau **revers-transcriptaze** care catalizează sinteza ADNmc complementar pe o matriţă monocatenară de ARN care constituie genomul retroviral. Din acest tip de sinteză rezultă o moleculă dublu catenară de ADN-ARN hibrid. Apoi, o hidrolază virală numită ribonuclează H degradează catena de ARN, din structura duplex-ului hibrid, iar catena de ADN rămasă este folosită ca matriţă pentru replicare pentru a rezulta ADNdc care conţine informaţia genomului viral.

La bolnavii cu SIDA, o fază critică este cea în care sute de „progenituri" de ADNdc produse în limfocitul T helper străpung membrana limfocitară distrugând acest important sistem imunitar.

17.2.6. Refacerea structurii cromatinei

În subcapitolul *Organizarea structurală a ADN* am arătat că celulele eucariote au cromatină şi nucleozomi, În celulele procariote ADN-ul este „dezgolit". Aşa cum s-a mai menţionat, organizarea cromatinei nucleare este implicată în iniţierea şi reglarea sintezei ADN. Recompunerea cromatinei după terminarea replicării constă în ansamblarea ADN-ului replicat în nucleozomi, formarea unor noi cantităţi de octameri histonici care, alături de octamerii preexistenţi, sunt distribuiţi pe fiecare braţ al bifurcaţiei de replicare. Aşa cum s-a arătat, asamblarea şi dezasamblarea structurilor cromatinice sunt mediate de chaperone ale histonelor. Un exemplu îl constituie **ASF1 (histone H3/H4 chaperone anti-silencing function 1)** care, în timpul reasamblării cromatinei „transferă" histone de la catena *mamă* la catena *fiică*.

În celulele umane replicarea genomului are loc numai în cursul fazei S numită sintetică, o perioadă din interfază, situată între fazele G_1 şi G_2. Faza G_2 separă faza S de faza M (mitotică) (*Figura 17.26*). După parcurgerea fazei G_1 celula intră în faza S când are loc sinteza ADN. Celula se pregăteşte pentru sinteza ADN în cursul fazei G_1, iar pentru mitoză se pregăteşte în cursul fazei G_2. Cu alte cuvinte intervalele G_1 şi G_2 dintre fazele S şi M nu sunt perioade inactive ci ele sunt esenţiale din punct de vedere reglator.

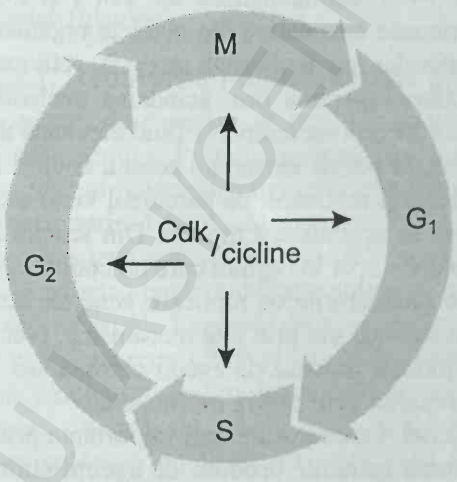


Figura 17.26. Ciclul celular la mamifere. Kinazele ciclin-dependente (Cdks) sunt reglatori ai ciclului celular în organismele eucariote. Amănunte în text.

Există defecte care împiedică celulele să parcurgă fazele în care aceste defecte au fost detectate, cum ar fi: (i) existenţa ADN-ului alterat în fazele G_1 şi/sau G_2; (ii) genomul este incomplet replicat; (iii) segregare cromozomală incompletă (fus de diviziune defect). Dacă defectul nu poate fi reparat celulele afectate suferă **apoptoză**. Faza G_0 situată în afara ciclului corespunde unei stări pasive (de repaus) a celulei. Celulele pătrund în această fază pornind de la un punct de control al fazei care poate fi un punct de restricţie în celulele mamiferelor sau punctul start în celulele de levuri. Această ieşire a celulei din ciclul celular se poate produce ca răspuns la lipsa factorilor de creştere sau a substanţelor nutritive. Deşi multe celule aflate în faza G_0 pot să moară odată cu organismul de care aparţin aceasta nu înseamnă că prin intrarea în faza G_0 ele sunt destinate să moară. Moartea lor este deseori consecinţa lipsei vreunui stimul ca ele să reintre în ciclul celular. În anul 2001 Leland Hartwell, Timothy Hunt şi Paul Nurse au primit Premiul Nobel pentru elucidarea rolului jucat de reglatorii cheie ai ciclului celular. Este vorba de cicline şi kinazele dependente de cicline.

17.2.7. Reglarea replicării şi relaţia cu cancerul

Proteinele numite **cicline** controlează evoluţia ciclică a celulelor prin activarea enzimelor numite **kinaze ciclin-dependente** (Cdk). Denumirea cicline se datorează variaţiei ciclice a concentraţiei acestor proteine în timpul ciclului celular, adică ea creşte şi descreşte în funcţie de fazele ciclului. O ciclină formează un complex cu o enzimă Cdk prin care enzima este activată. Această kinază fosforilează substraturi care determină progresia celulei de-a lungul ciclului. Un exemplu este **ciclina D**, component al unui punct de restricţie la mamifere, care declanşează iniţierea fazei S şi sinteza ADN. Există trei cicline D: D_1, D_2 şi D_3. Aceste cicline activează două kinaze: Cdk4 şi Cdk6 care sunt sintetizate în timpul fazei G_1. Cdk4 şi Cdk6 fosforilează produsul **genei retinoblastomului** (pRb). Acest produs este o proteină de supresie tumorală care este nefuncţională în multe tipuri de cancer. O funcţie importantă a pRb este aceea de a preveni multiplicarea excesivă a celulei prin inhibarea progresiei ei în ciclul celular până când este gata să se dividă. pRb este un reglator al ciclului deoarece se asociază cu şi

inactivează un factor de transcriere (exprimat de gena *E2F*) necesar transcrierii unor gene de care depinde progresia de la faza G_1 la faza S. Alte sisteme de kinaze ciclin-dependente importante pentru progresia ciclului celular sunt ciclina B-Cdk1 implicată în reglarea tranziţiei $G_2 \rightarrow M$ şi acţiunea secvenţială a ciclinelor E şi A asupra Cdk2 necesară iniţierii sintezei ADN în cursul fazei S.

Analiza proceselor maligne la om a relevat faptul că unele proteine care sunt alterate în cancer sunt implicate în controlul tranziţiei $G_1 \rightarrow S$. Procesele patogenetice care pot altera aceste proteine, determinând diviziune celulară anormală sau scăpată de sub control, ar putea fi:

- producerea excesivă a unei cicline,
- pierderea unui inhibitor specific al Cdk,
- activarea unui sistem ciclină-Cdk la un moment neadecvat.

Se cunosc câteva mecanisme ale proceselor patogenetice menţionate mai sus.

- calea Cdk-ciclină D/INK4/pRb/E2F este alterată în majoritatea cazurilor. Alterarea ei poate fi cauzată de mutaţii ale genelor care codifică aceste proteine sau regulatorii lor situaţi în amonte. INK4 (**inhibitor of cyclin-dependent kinase 4**) este o familie de proteine ankirin-repetitive (de supresie tumorală) care cuprinde 4 membri: p16, p17, p18 şi p19. Scăparea de sub control a activităţilor Cdk4 şi Cdk6 prin supraproducţia ciclinelor D sau prin pierderea proteinelor familiei INK4 conduce întotdeauna la hiperproliferare celulară şi, eventual, la dezvoltarea tumorilor. Activităţile Cdk4 şi Cdk6 sunt amplificate sau proteinele acestor enzime sunt supraexprimate în numeroase tumori umane. Oncogena *bcl* (asociată limfoamelor celulelor B) pare a fi gena ciclinei D_1.
- unele virusuri care induc cancer (oncovirusuri) şi unele gene inductoare de cancer (oncogene) sunt capabile să altereze tranziţia $G_1 \rightarrow S$ a celulelor mamiferelor.
- proteinele *transformatoare* (oncoproteine) produse de unele virusuri ADN ţintesc proteina represoare de transcriere pRb pe care o inactivează. În acest fel oncoproteinele sunt implicate în diviziuni celulare „scăpate" de sub control.

În ce priveşte nivelele enzimelor şi substraturile replicării este de notat că, în cursul fazei S, celulele mamiferelor au nivele mai ridicate ale activităţii polimerazelor şi ale enzimelor responsabile pentru formarea substraturilor (dezoxinucleotide) decât în cursul fazelor nesintetice ale ciclului. După terminarea replicării ADN-ului nuclear şi recompunerea cromatinei, aceasta este marcată astfel încât să fie prevenită replicarea ei până la următorul ciclu mitotic. Altfel spus, în timpul fazei S, ADN-ul nuclear este complet replicat (exceptând eroziunea telomerică) **o dată şi numai o dată**.

17.3. Repararea ADN

Menţinerea integrităţii informaţiei din moleculele de ADN este esenţială pentru supravieţuirea unui organism, implicit a speciei din care acesta face parte. Această necesitate a condus la perfecţionarea mecanismelor de reparare a ADN-ului deteriorat fie datorită erorilor de replicare, fie a leziunilor provocate de agenţii din mediul înconjurător.

Fidelitatea replicării este asigurată de împerecherea adecvată, în conformitate cu principiul Watson-Crick, a bazelor care aparţin catenelor care constituie ADNdc. Corectitudinea împerecherii depinde de prezenţa tautomerilor favorizaţi termodinamic ai nucleotidelor purinice şi pirimidinice. Echilibrul dintre tautomerul mai stabil şi cel mai puţin stabil ai unui nucleotid este 10^4 sau 10^5 în favoarea celui mai stabil, ceea ce ar explica o fidelitate inferioară celei asigurate în realitate: o mutaţie la 10^{10} nucleotide inserate per generaţie. Faptul se explică prin existenţa unui al doilea control în afara celui termodinamic. Acest control este creat de intervenţia unei activităţi de „corectare în şpalt" (**proof reading**) atât în celulele bacteriene cât şi în cele ale mamiferelor. La *E. Coli,* ea previne inserţia definitivă a unui nucleotid aberant prin intervenţia activităţilor $3' \rightarrow 5'$ exonucleazice ale Pol I şi Pol III. Complexele enzimatice din celulele organismelor mamiferelor nu realizează această activitate de corectare, repararea prin scindarea nucleotidului aberant încorporat temporar fiind efectuată de alte enzime. În pofida existenţei acestui control dublu al fidelităţii replicării, pe parcursul vieţii unui organism se acumulează mutaţii. Din fericire multe din acestea apar în regiuni care nu codifică proteine. În plus, erorile de replicare generate cum s-a arătat mai sus sau prin alte mecanisme, precum şi deteriorările produse de agenţi chimici sau fizici, sunt reparate prin câteva mecanisme.

Există 4 mecanisme mai importante prin care se repară leziunile produse de agenţii chimici şi fizici arătaţi mai jos. Aceste mecanisme sunt:

- repararea împerecherilor „greşite" (**mismatch repair**),

- repararea prin excizia bazelor,
- repararea prin excizia nucleotidelor (NER),
- repararea catenelor clivate simultan din dupleXul de ADN.

În general, regiunea dintr-o catenă de ADN care conține defecte este readusă la forma originală pe baza informației conținută în regiunea corespunzătoare a catenei complementare neafectate.

Alterarea unei baze poate fi determinată de agenții chimici prin:

- depurinare (hidroliza legăturii N-glicozidice din nucleotidele purinice),
- dezaminare cu acid azotos (citozină → uracil; adenină → hipoxantină),
- alchilarea bazelor,
- inserția sau deleția unui nucleotid,
- încorporarea analogilor de nucleotide.

Alterarea fizică sau chimică a două baze situate pe aceeași catenă:

- formarea dimerilor pirimidinici (timină-timină, timină-citozină sau citozină-citozină) sub acțiunea razelor UV,
- reticularea (**cross-linkage**) cu agenți de alchilare bifuncționali.

Ruperea catenelor de ADN sub acțiunea:

- radiațiilor ionizante,
- dezintegrării radioactive a scheletului ribozofosfodiesteric al ADN,
- radicalilor liberi (specii reactive ale oxigenului).

Reacții de reticulare care implică ADNdc:

- reticularea bazelor situate față în față (**vis-à-vis**) pe cele două catene,
- reacții între moleculele de ADN și moleculele proteice (histone).

17.3.1. Repararea împerecherilor greșite

Acest tip de reparare se produce în timp ce ADN-ul se replică. Proteine specifice „scanează" catena *fiică* și marchează defectul prin metilarea adeninei cuprinsă în două secvențe 5'-GATC-3' situate pe catena matriță. În acest fel, bazele metilate încadrează nucleotidul aberant de pe catena *fiică* (cu mutație). Exemple de erori de împerechere pot fi inserția CMP *vis-à-vis* de AMP sau inserția a două sau mai multe nucleotide neîmperecheate, cauzată de „derapajul" polimerazei, care se soldează cu formarea unor mici bucle neîmperecheate de ADN. Adeninele metilate sunt decelate de enzimele reparatoare, adică este identificat ADNmc care conține nucleotidul aberant. Așa cum se vede în *Figura 17.27*, o endo-

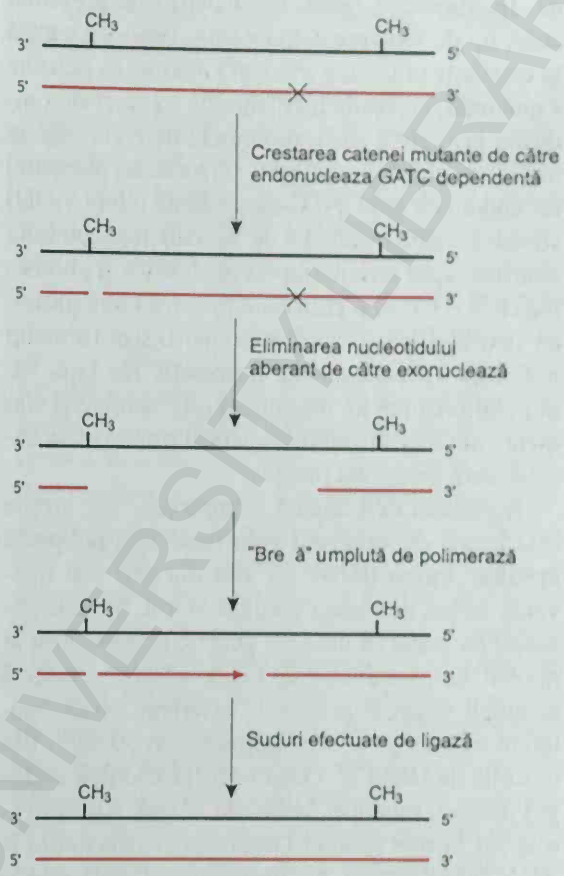


Figura 17.27. Mecanismul reparării împerecherilor greșite ale ADN.

nuclează GATC-dependentă clivează catena mutantă vis-à-vis de una din adeninele metilate (situată mai aproape de capătul 5' al catenei mutante) iar apoi o 5' → 3' exonucleză „digeră" fragmentul de ADNmc cuprins între crestătură și un punct situat *vis-à-vis* de următoarea adenină metilată dintr-o secvență 5'-GATC-3'. În final, breșa lăsată de acțiunea exonucleazei este completată sub acțiunea 5' → 3' polimerazei iar capetele fragmentului sintetizat sunt „sudate" la capetele restului catenei supuse reparării de către o ligază. Distanța dintre o secvență GATC și nucleotidul aberant poate atinge 1 kb ceea ce arată că mecanismul reparării împerecherii greșite este destul de costisitor și ineficient.

În *E. coli*, există 3 proteine (MutS, MutL și MutH) care recunosc și „crestează" catena mutantă. Alte enzime ca exonucleaza, polimeraza și ligaza au funcțiile menționate, la care se adaugă SSBPs implicate în toate procesele care necesită despiralarea ADNdc. La mamifere sistemul de proteine de recunoaștere a defectelor este ceva mai complicat; în loc de 3 sunt implicate 6 protei-

ne. În filmuleţul [anim-mismatch] este prezentat acest tip de reparare a ADN-ului. Defectul constă în existenţa uracilului în locul citozinei ca pereche a guaninei, grupările metil ataşate *a priori* sunt indicate prin sfere roşii, proteinele de recunoaştere (dimerul) elimină uracilul (excizia bazei aberante) iar endonucleaza GATC-dependentă (sfera violet) clivează catena mutantă la nivelul nucleotidului apurinic, apoi activităţile exonucleazică şi polimerazică 5' → 3' sunt comasate într-o singură proteină (ovoidul roşu), apoi intervine ligaza (dimerul roz) care sudează catena procesată. De fapt, filmuleţul prezintă un mecanism care conţine şi elemente ale mecanismului reparării prin excizia bazelor care este tratat mai jos.

Repararea defectuoasă a împerecherilor greşite este legată de **cancerul colorectal non-polipozic ereditar uman** (HNPCC), una din cele mai frecvente forme de cancer ereditar la om. Studiile genetice au arătat că defectul genetic este localizat la nivelul cromozomului 2. Gena *hMSH2,* codifică analogul uman al proteinei bacteriene MutS. Mutaţiile acestei gene sunt implicate în 50–60% din cazurile de HNPCC. Gena *hMLH1* codifică analogul uman al proteinei MutL din *E. coli*. Aşa cum s-a arătat la subcapitolul *Organizarea structurală a ADN*, instabilitatea microsateliţilor (MSI) este o consecinţă a erorilor de replicare, HNPCC fiind una din primele boli asociate cu ea. Celulele canceroase au microsateliţi a căror lungime diferă de cea a microsateliţilor din celulele normale. Se pare că celulele în acest tip de cancer conţin o genă *hMSH2* sau *hMLH1* mutantă deci nu exprimă proteine de recunoaştere normale prin care să fie reparate împerecherile greşite. Prin urmare, aceste celule nu sunt capabile să elimine micile bucle de ADN neîmperecheat, ceea ce conduce la creşterea în lungime a microsateliţilor. Expansiunea microsateliţilor afectează celulele normale ale colonului şi rectului uman prin apariţia HNPCC.

17.3.2. Repararea prin excizia bazelor

Depurinarea hidrolitică a ADN, se produce spontan ca urmare a hidrolizei legăturilor N-glicozidice din structura nucleotidelor purinice. Ea este una din principalele cauze ale alterării la care este supus în timp **ADN fosil**. Totuşi, în celulele vii sunt enzime specifice care recunosc pentozele (depurinate) şi le înlocuiesc direct cu nucleotide fără a afecta scheletul fosfodiesteric.

Pe de altă parte, citozina, adenina şi guanina se pot transforma spontan, prin pierderea grupărilor *amino*, în uracil, hipoxantină, respectiv xantină. Bazele rezultate nu se găsesc în mod obişnuit în ADN, de aceea sunt uşor de recunoscut de **N-glicozilaze** specifice care le îndepărtează din structura ADN. Pentozele rămase după eliminarea bazelor neobişnuite sunt recunoscute de o **endonuclează apurinică** sau **apirimidinică** care excizează aceste pentoze. În final o polimerază reparatoare şi o ligază refac ADN-ul în forma sa originală. Această serie de evenimente constituie repararea prin excizia bazelor (*Figura 17.28*). Printr-o serie similară de evenimente pot fi îndepărtate bazele alchilate şi analogii acestora. Acest mecanism este adecvat pentru înlocuirea unei singure baze dar nu poate înlocui regiuni mai mari de ADN deteriorat.

17.3.3. Repararea prin excizia nucleotidelor

Acest mecanism stă la baza înlocuirii unor regiuni din ADN de până la 30 de baze deteriorate. Astfel de alterări ale ADN sunt cauzate de razele ultraviolete, care pot induce dimerizarea pirimidinelor (ciclobutan pirimidinic), şi de fumat care cauzează formarea de aducţi de **benzo[*a*]pirenguanină**. O serie de factori fizici şi chimici (ra-

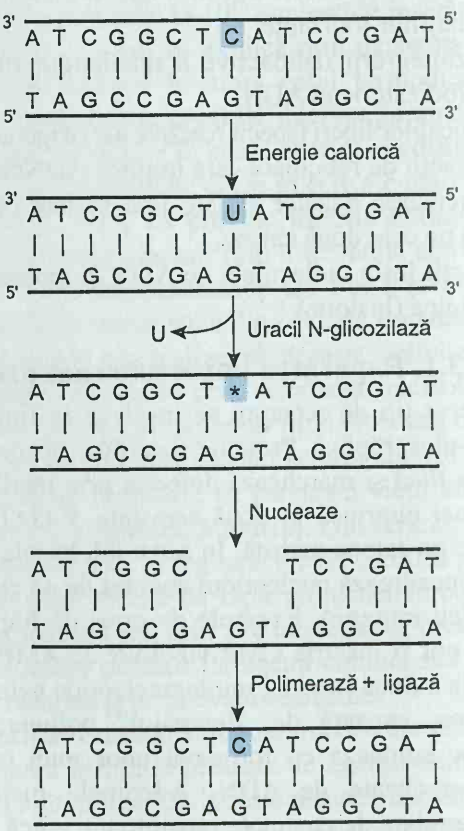


Figura 17.28. Mecanismul reparării ADN prin excizia bazelor.

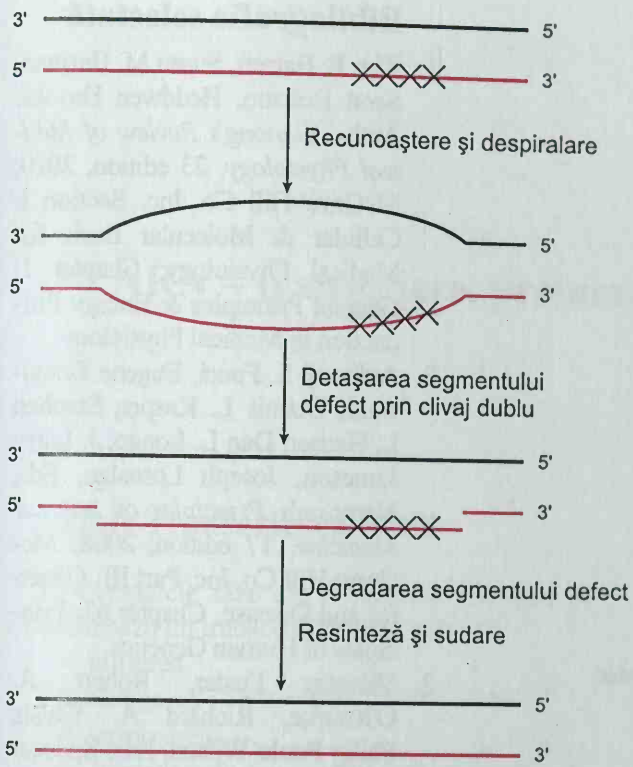


Figura 17.29. Mecanismul reparării ADN prin excizia nucleotidelor.

diaţii ionizante, medicamente anticancerigene, unele chimicale din mediul înconjurător) cauzează modificarea bazelor, clivarea catenelor de ADN, reticularea bazelor, reacţii între ADN şi histone. Aceste alterări sunt reparate prin excizia nucleotidelor (*Figura 17.29*). Acest mecanism implică mai multe proteine decât mecanismele de reparare anterioare (repararea împerecherilor greşite şi excizia bazelor). În *E. coli* acest tip de reparare este controlat de un complex enzimatic numit **Uvr** care constă din 4 proteine: UvrA, UvrB, UvrC şi UvrD (helicaza II). La început complexul UvrA-UvrB scanează ADN-ul, iar UvrA recunoaşte distorsiunile duplex-ului cauzate de dimerul ciclobutan sau de defectul notat cu XXXX. Dacă distorsiunile sunt sesizate UvrA se disociază din complex şi UvrB „topeşte" (despiralează) duplex-ul în regiunea distorsionată. Apoi UvrB recrutează UvrC care face o incizie cu 8 nucleotide în amonte (către capătul 5') şi cu 4 nucleotide în aval de regiunea distorsionată, ceea ce determină excizia unui fragment de 12 nucleotide din ADNmc, ajutată de UvrD. Breşa rezultată este apoi completată prin acţiunea Pol I (la om, polimeraza δ/ε), iar fragmentul resintetizat este re-sudat de o ligază.

17.3.4. Repararea catenelor clivate simultan din duplexul de ADN

Repararea catenelor clivate simultan din duplexul ADN este o parte a procesului fiziologic prin care gena unei imunoglobuline este supusă rearanjării. Acesta este un mecanism de reparare a ADN-ului alterat sub acţiunea razelor ionizante sau a radicalilor liberi. Unii agenţi chimioterapeutici distrug celulele deoarece ei provoacă acest tip de clivare sau împiedică repararea leziunilor produse în acest mod. Există două proteine care sunt implicate iniţial în reconectarea neomoloagă a capetelor ADNmc rezultate în urma clivării simultane la care a fost supus ADNdc. Proteina **Ku**, care este conservată în scară filogenetică de la bacterii până la om, este un heterodimer ale cărui subunităţi, 70 kDa şi 86 kDa, se asociază la capetele ADN. Cu fişierul de coordonate atomice cu codul PDB [1JEY] se poate vizualiza structura heterodimerului Ku uman asociat la un segment de ADNdc constituit din 55 de nucleotide. Ku are o activitate ATP-dependentă latentă de **helicază**. După asocierea la ADN a heterodimerului Ku, este recrutată o a doua proteină, o protein kinază ADN-dependentă (**DNA-PK**). Aceasta dispune de un situs de legare a capetelor libere de ADN şi un alt situs pentru asocierea ADNdc, ceea ce corespunde pasului poziţionării spre interior a capetelor libere. Complexul constituit din capătul liber de ADN, Ku şi DNA-PK activează kinaza ultimei componente care, la rândul ei, fosforilează Ku şi cealaltă moleculă de DNA-PK situată pe celălalt capăt, separate de ADN, în poziţie *trans*. Apoi, DNA-PK se disociază de ADN şi de Ku, eveniment care se soldează cu activarea helicazei conţinute în Ku. Efectul acestei activităţi este despiralarea celor două capete ale ADN. După refacerea perechilor de baze între capetele despiralate, capetele neîmperecheate sunt eliminate sub acţiunea unei exonucleaze, iar breşele sunt „umplute" de o polimerază şi de o ligază (*Figura 17.30*).

Xeroderma pigmentosum (XP) este o boală genetică autozomală recesivă. Sindromul clinic include o sensibilitate pronunţată la razele UV cu apariţia ulterioară a cancerului de piele şi moarte prematură. Faţă de persoanele sănătoase, la indivizii cu XP riscul dezvoltării cancerului de piele este de 1.000-2.000 de ori mai mare. Cercetările efectuate pe culturi de fibroblaste au arătat că, dacă acestea sunt normale, jumătate din

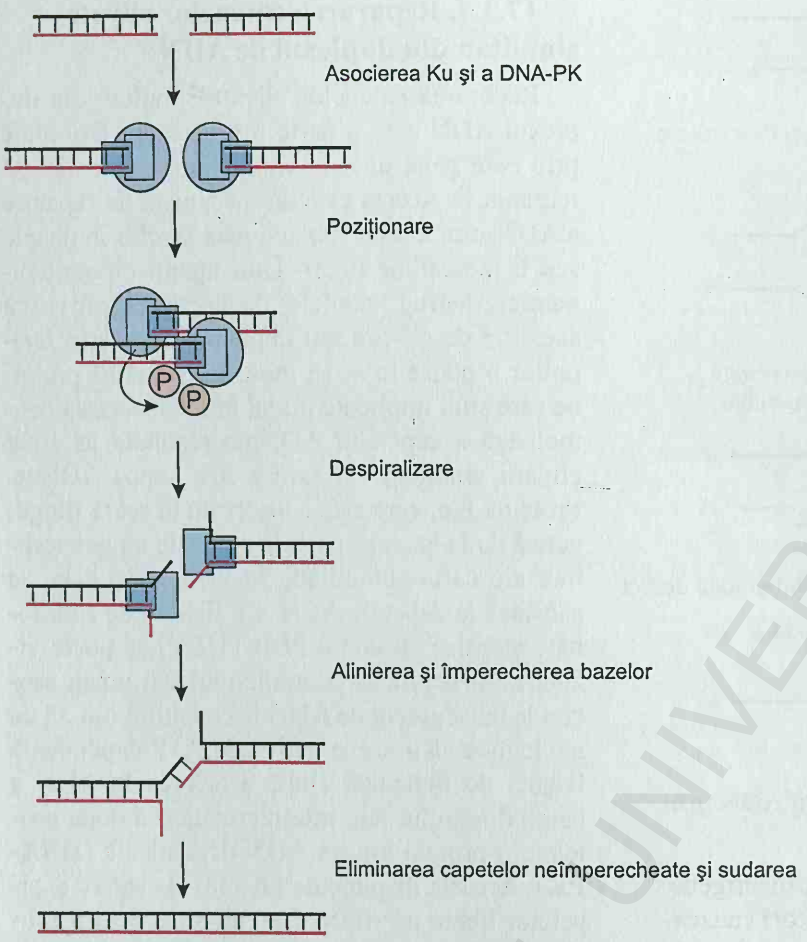


Figura 17.30. Mecanismul reparării catenelor clivate simultan din duplexul de ADN

dimerii pirimidinici produşi de razele UV sunt excizaţi în mai puţin de 24 ore printr-un mecanism de tip excizia nucleotidelor. Din contră, în culturile de fibroblaste provenite de la bolnavi cu XP, excizarea dipirimidinelor este neglijabilă. Această boală relevă importanţa proceselor de reparare a alterărilor ADN. Bolnavii cu **ataxie-telangiectazie,** de asemenea o boală autozomală recesivă, dezvoltă ataxie cerebelară şi neoplasm limforeticular. Ei manifestă o sensibilitate crescută la leziunile provocate de iradierea cu raze X. **Anemia Fanconi**, o altă boală autozomală recesivă, se corelează cu instabilitate cromozomală datorită unei deficienţe a capacităţii de reparare a leziunilor produse prin reticulare.

Bibliografie selectată

1. Kim E. Barrett, Susan M. Barman, Scott Boitano, Heddwen Brooks, Auths, *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23 edition, 2010, McGraw-Hill Co. Inc. Section I: Cellular & Molecular Basis for Medical Physiology, Chapter 1: General Principles & Energy Production in Medical Physiology.
2. Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo, Eds, *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17 edition, 2008, McGraw-Hill Co. Inc. Part III: Genetics and Disease, Chapter 62: Principles of Human Genetics.
3. Valentin Fuster, Robert A. O'Rourke, Richard A. Walsh, Philip Poole-Wilson, Eds, Spencer B. King III, Robert Roberts, Ira S. Nash, Eric N. Prystowsky, Assoc. Eds, *Hurst's The Heart*, 12 edition, 2008, McGraw-Hill Co. Inc. Part 2: Foundations of Cardiovascular Medicine, Chapter 9: Genetic Basis for Cardiovascular Disease.
4. Stephen J. McPhee, Maxine A. Papadakis, Eds, *Current medical diagnosis & treatment*, 49 edition, 2010, Lange, Chapter 40: Clinical Genetic Disorders
5. Robert K. Murray, David A Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil, Auths, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 28 edition, 2009, McGraw-Hill Co. Inc. Section IV. Structure, Function, & Replication of Informational Macromolecules.
6. Boro Dropulic, Barrie Carter, Eds., *Concepts in Genetic Medicine*, 2008, John Wiley & Sons Inc., Chapter 7: Herpes Simplex Virus Vectors, pp.85-91.
7. Stephen J. McPhee, Gary D. Hammer, Eds, *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, 6 edition, 2010, McGraw-Hill Co. Inc. Chapter 2: Genetic Disease.

BCU MEDICINA - UNIVERSITARA

Capitolul 18.
ARN – transcriere, prelucrare şi reglarea exprimării genice

Ştefan Hobai, Octavian Popescu

18.1. Transcrierea ADN

Principalele faze ale procesului prin care se sintetizează un transcript primar sunt:

- iniţierea
- elongarea
- terminarea.

În prezent cele mai multe informaţii de care dispunem se referă la iniţiere. Există câteva regiuni ale ADN situate în amonte de locul iniţierii şi câteva proteine care se asociază la aceste regiuni pentru a regla iniţierea transcrierii. Alte aspecte cunoscute ale transcrierii sunt:

- existenţa unor diferenţe semnificative între timpii de viaţă ai unor molecule de ARN mesager (ARNm) cu repercusiuni asupra vitezelor de sinteză a proteinelor care determină modificări metabolice şi fenotipice;
- mecanisme prin care organismele, în special procariote, se adaptează la schimbarea condiţiilor de mediu;
- diferenţierea structurală şi funcţională a celulelor;
- existenţa în celulele mamiferelor a unor forme precursoare de ARN care ulterior sunt prelucrate pentru a rezulta formele mature, active ale ARN. O transformare importantă realizată în cursul prelucrării post-transcriere este excizarea din ARN a secvenţelor corepunzătoare intronilor, cu denumirea splicing;
- faptul că erorile de sinteză şi prelucrare a transcript-ului primar pot cauza boli.

Descrierea fazelor transcrierii se referă în mare măsură la organismele mamifere. Unele observaţii se vor referi la organismele procariote (bacterii, virusuri), însă, cu aproximaţie, ele pot fi extrapolate la mamifere.

Celulele eucariote conţin 4 tipuri de ARN:

- ribosomal (ARNr)
- mesager (ARNm),
- de transfer (ARNt)
- ARN-ul mic se împarte în ARN nuclear mic (ARNnm) şi microARN (miARN).

Primele 3 tipuri sunt implicate în sinteza proteică, în timp ce ARN-ul mic este implicat în splicing-ul ARNm precursor şi modularea exprimării genelor.

Există asemănări între sintezele ADN şi ARN. Ele sunt similare prin:

- strategiile principalelor faze: iniţierea, elongarea şi terminarea, inclusiv prin respectarea polarităţii catenelor acestor acizi nucleici prin sensul 5' → 3' de sinteză a noilor catene;
- existenţa unor mari complexe de iniţiere constituite din mai multe componente;
- respectarea principiului de complementaritate Watson-Crick în formarea perechilor de baze.

Principalele diferenţe între aceste sinteze sunt:

- în timp ce replicarea foloseşte dezoxiribonucleotide pentru elongarea catenelor nou-sintetizate, transcrierea foloseşte ribonucleotide;
- în transcriere, ca bază complementară a adeninei din catena matriţă, intră uracilul şi nu timina (aşa cum se întâmplă în cazul replicării);
- transcrierea nu implică amorse deoarece ARN polimeraza are capacitatea să iniţieze sinteza *de novo*;
- spre deosebire de replicare, în care întregul genom este copiat o dată şi numai o dată în

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cursul unui ciclu celular, transcrierea implică numai anumite porţiuni ale genomului;
- în transcriere nu se exercită vreo funcţie de „corectare în şpalt" cu activitate înaltă şi eficientă.

Întrucât în transcriere numai una din catenele ADN participă activ la sinteza noii catene de ARN există o nomenclatură care face distincţie între catenele ADN. Catena care este transcrisă se numeşte catenă matriţă. Cealaltă catenă a ADN se numeşte ne-matriţă sau codificatoare. Al doilea nume este justificat de faptul că, cu excepţia înlocuirii timinei cu uracil (timina este uracil metilat) secvenţa catenei codificatoare este identică cu secvenţa transcript-ului primar care se traduce în produsul final al genei (proteina). Este de notat că o catenă din ADNdc serveşte ca matriţă pentru unele gene, iar catena codificatoare este matriţă pentru alte gene, altfel spus, transcrierea se poate face folosind ca matriţă ambele catene ale ADNdc.

18.1.1. Polimerazele transcrierii

ARN polimeraza ADN-dependentă de la procariote (pe scurt ARNP) este enzima responsabilă pentru sinteza transcript-ului primar. Enzima se ataşează de o secvenţă specifică din structura catenei matriţă numită **promotor**. Apoi, are loc iniţerea sintezei ARN la **punctul start** care va continua până la terminare. **Unitatea de transcriere** este o regiune a ADN care include semnalele necesare iniţierii, elongării şi terminării transcrierii. Transcript-ul primar se obţine prin sinteza ARN în direcţia 5' → 3'. Viteza de transcriere variază de la genă la genă. În timp ce la procariote transcript-ul ARN este produsul mai multor gene adiacente, componente ale unui operon, la mamifere transcript-ul este produsul unei singure gene. Dacă o unitate de transcriere conţine o singură genă, atunci capătul 5' al transcriptului primar este identic cu cel al ARN-ului matur. Astfel punctul start al transcrierii corespunde nucleotidului de la capătul 5' al ARNm. Acest nucleotid este desemnat ca **poziţia +1** din catena de ADN matriţă. Prin convenţie s-a stabilit că pornind de la acest punct în aval numărul poziţiei creşte (+2, +3 etc.), iar în amonte numărul poziţiei scade (-1, -2 etc.; vezi *Figura 18.4*).

Structura cuaternară a ARNP din *E. coli* constă într-un **complex minimal (apoenzimă)** format din 2 subunităţi α identice, alte 2 subunităţi neidentice β şi β' şi o subunitate ω. **Holoenzima** acestei polimeraze conţine în plus subunitatea σ

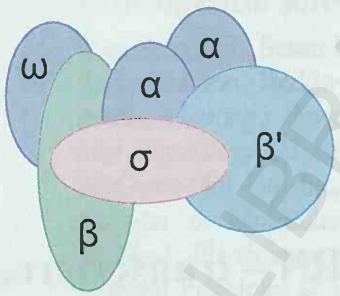


Figura 18.1. Structura cuaternară a ARNP

(*Figura 18.1*) care, odată ce s-a legat la apoenzima $\alpha_2\beta\beta'\omega$, îl ajută să recunoască secvenţele **consens** -35 şi -10 situate în amonte de punctul start (+1). Segmentele de ADNdc care conţin aceste secvenţe constituie regiunea **promotor**. Prin recunoaşterea secvenţelor -35 şi -10, holoenzima se asociază la promotor pentru a forma **complexul de preiniţiere** (CPI).

Caracteristic pentru regiunea -10 a promotorului este „motivul secvenţial" **TATA**. Ambele regiuni, -35 şi -10, se numesc secvenţe ale flancului 5' deoarece ele sunt plasate dincolo de punctul start, în direcţia capătului 5' al catenei codificatoare. „Ochiul" de transcriere este o regiune de aproximativ 20 pb de ADNdc „topit", iar complexul enzimatic acoperă 30-70 pb depinzând de conformaţia ARNP. Spre deosebire de procariote, la eucariote ARN polimerazele nu recunosc direct secvenţele din promotor şi este necesar ca o colecţie de proteine, numite **factori generali de transcriere**, să medieze asocierea polimerazelor la ADN pentru a forma complexul de preiniţiere al transcrierii. ARN polimerazele din celulele eucariote au structuri mai complexe decât cea din celulele procariote. Ele conţin două subunităţi mari şi un număr de subunităţi mai mici, 14 de exemplu în cazul polimerazei III. Totuşi, subunităţile polimerazelor eucariotelor prezintă ample omologii de structură primară şi chiar terţiară cu polimerazele speciilor procariote. O toxină peptidică, **α-amanitina**, produsă de ciuperca *Amanita phalloides*, este un inhibitor diferenţial pentru cele 3 ARN polimeraze ADN-dependente din nucleul celulelor eucariote (*Tabelul 18.1*). Acţiunea toxică a acestui peptid constă în blocarea translocării enzimei, adică a deplasării ei de-a lungul duplexului ADN, în timpul formării legăturii fosfodiesterice din catena de ARN. În tabelul de mai jos sunt prezentate sensibilităţile polimerazelor la α-amanitină şi produsele activităţii lor.

Tabelul 18.I. ARN polimerazele nucleare eucariotice şi sensibilitatea acestora la acţiunea α-amanitinei. Sunt menţionate şi produsele acţiunii acestor enzime

Tipul ARN polimerazei	Sensibiliatea la α-amanitină	Produse
I	Insensibilă	ARNr
II	Foarte sensibilă	ARNm, miARN, ARNnm
III	Sensibilitate moderată	ARNt, ARNr

Transcript-ul primar generat sub acţiunea ARN polimerazei II este imediat protejat la capătul 5' cu 7-metilguanozin trifosfat care persistă şi în structura ARNm matur (citoplasmatic). Acest „capac" de protecţie este necesar prelucrării ulterioare a transcript-ului primar, traducerii la care participă ARNm matur şi protejării acestuia faţă de acţiunea exonucleazei 5' → 3'.

18.1.1.1. Fazele transcrierii

Iniţierea sintezei ARN la bacterii începe cu asocierea holoenzimei ARN polimerazei la promotorul din catena matriţă de ADN pentru a forma CPI. Urmează o modificare conformaţională a ARNP şi despiralarea ADN. Primul ribonucleotid (o purină) se asociază la subunitatea β a holoenzimei şi în prezenţa următorului ribonucleotid se condensează cu acesta sub acţiunea catalitică a ARNP formând o legătură fosfodiesterică. *Figura 18.2*, înfăţişând fazele transcrierii, este o schemă simplificată în care aceste detalii de mecanism nu sunt relevate. În acest moment catena nascentă, care constă într-un dinucleotid, este ataşată la subunitatea β a ARNP, primul nucleotid păstrându-şi gruparea trifosforică din poziţia 5', atât la procariote cât şi la eucariote. Mecanismul chimic al formării legăturilor fosfodiesterice este similar cu cel al condensării dezoxiribonucleotidelor descris la replicare. După polimerizarea a 10-20 de nucleotide ARNP suferă a doua modificare conformaţională care determină îndepărtarea fizică a polimerazei de regiunea promotor (**promoter clearance**) prin care sistemul trece la faza elongării.

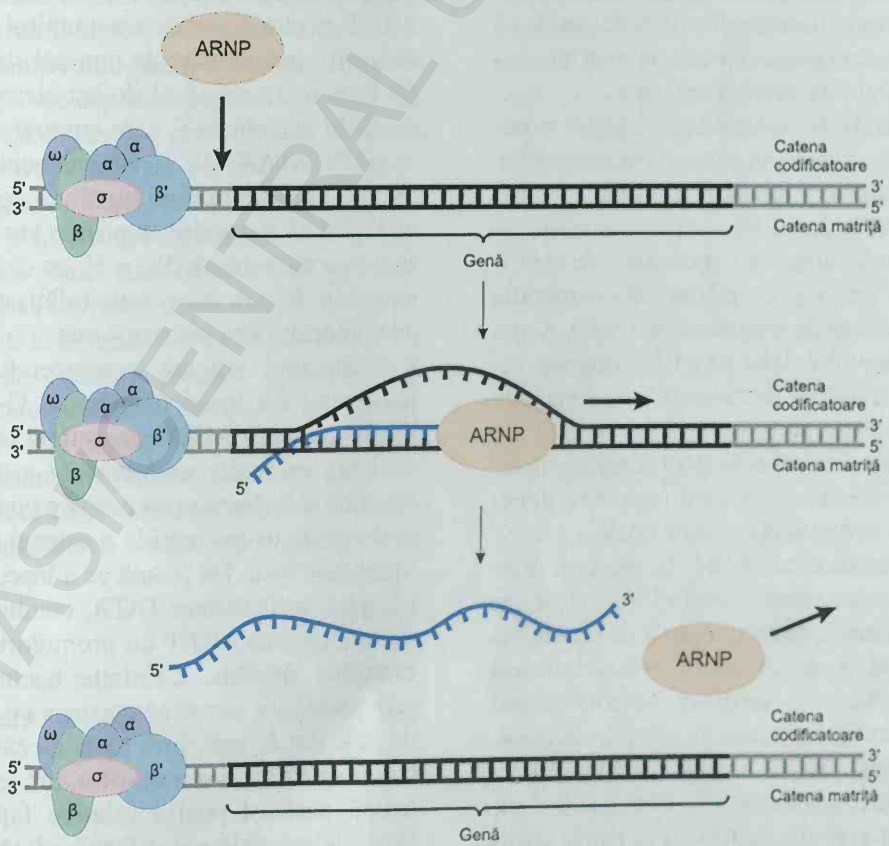


Figura 18.2. Fazele transcrierii la procariote.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

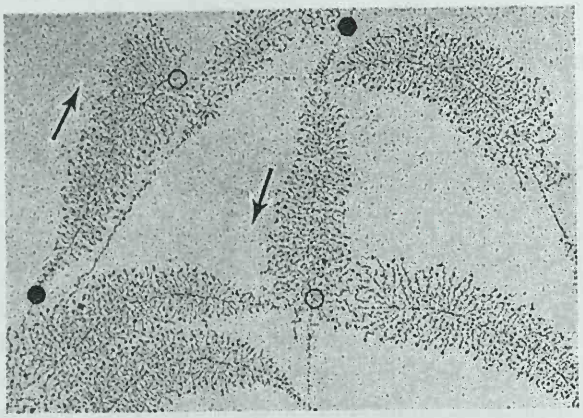


Figura 18.3. Creşterea lungimii moleculelor de ARN ribosomal pe parcursul transcrierii sub acţiunea ARN polimerazei din din mormolocul de broască. Săgeţile din imagine indică sensul 5' → 3' de avansare a moleculelor de ARN polimerază I.

Elongarea este faza în care ARNP progresează de-a lungul moleculei de ADN pentru a cataliza ciclurile de formare a legăturilor fosfodiesterice. Simultan sub acţiunea unei despiralaze intrinseci are loc despiralarea progresivă a ADNdc. Prin respiralarea ADN se menţine constant „ochiul" de transcriere de cca. 20 pb. Se pare că dimensiunea acestui ochi este dictată de polimerază, ea fiind independentă de secvenţa ADN. Acest ochi permite bazelor din ribonucleotide să se împerecheze cu bazele din catena matriţă conform principiului de complementaritate.

Despiralarea ADN provoacă dezintegrarea nucleozomilor din celulele eucariote. Prin intervenţia, în cursul transcrierii, a **topoizomerazelor** la eucariote şi a **girazei** la procariote se previne tensionarea datorată supraînfăşurării moleculei de ADN. Imaginea din *Figura 18.3* înfăţişează micrografia electronică, realizată la magnitudinea 6000, a mai multor copii ale moleculelor de ARNr amfibian rezultate prin transcriere. Se observă că lungimea transcript-elor creşte pe măsură ce moleculele de ARN polimeraza I avansează de-a lungul genelor pornind de la situs-ul de iniţiere (cercurile pline) până la situs-ul terminării (cercurile goale).

Terminarea sintezei ARN la bacterii este semnalată de o secvenţă specifică din structura catenei matriţă care este recunoscută de o proteină numită **factorul ρ**. Acest factor este o helicază ATP-dependentă care desface helixul hibrid ARN-ADN care se formează în cursul elongării. La unele bacterii ARNP recunoaşte direct secvenţa ADN care semnalizează terminarea transcrierii, fără intervenţia factorului ρ. După terminarea sintezei ARN polimeraza se separă de ADN şi disociază în apoenzimă şi subunitatea σ libere. Apoi, cu ajutorul altei subunităţi σ, apoenzima recunoaşte un promotor de la care începe sinteza unei noi molecule de ARN. La eucariote mai multe molecule de ARNP pot transcrie simultan aceeaşi genă de pe catena matriţă prin procese defazate spaţial. În *E. coli* există elemente ρ-dependente care semnalizează terminarea transcrierii. Acestea conţin **secvenţe consens** a căror transcriere generează un transcript care adoptă o structură de buclă ce seamănă cu o agrafă. Această buclă induce o pauză în desfăşurarea transcrierii care permite factorului ρ să determine disocierea polimerazei de ADN prin disocierea duplex-ului hibrid (ARN-ADN), graţie activităţii de helicază ATP-dependentă a acestui factor.

18.1.2. Promotori bacterieni şi eucariotici

Promotorul din *E. coli* constă în 4 spire de ADNdc (cca. 40 pb), o regiune destul de mică pentru a putea fi acoperită de o moleculă de holoenzimă ARNP. Într-un promotor există 2 secvenţe (**elemente**) scurte, bine conservate genetic: (i) la cca. 35 pb în amonte de punctul start (+1) există un element de 8 pb care conţine secvenţa consens 5'-TGTTGACA-3', la care se asociază ARNP pentru a forma aşa-numitul **complex închis**; (ii) mai aproape de punctul start, la cca. 10 pb în amonte există al doilea element, de 6 pb, bogat în perechi A-T, care conţine secvenţa consens 5'-TATAAT-3'. Acest element se mai numeşte **casetă Pribnow**. Cuvântul „consens" indică faptul că transcript-ul primar are aceeaşi polaritate (acelaşi sens), 5' → 3', cu catena codificatoare. În *Figura 18.4* sunt înfăţişate elementele promotorului discutate mai sus.

Elementul -10 are o temperatură de topire joasă datorită lipsei de perechi G-C; el se numeşte „caseta" **TATA** care suferă cu uşurinţă disocierea catenelor componente astfel că ARNP asociată la regiunea promotoare poate avea acces la secvenţa de nucleotide a catenei matriţă aflate imediat în aval. De îndată ce a început disocierea (despiralarea) casetei TATA, combinaţia formată de holoenzima ARNP cu promotorul se numeşte **complex deschis**. Celelalte bacterii conţin în promotorii lor secvenţe consens cu puţin diferite de cele din *E. coli*, însă toate au câte 2 elemente în componenţa promotorilor lor, elemente care ocupă aceleaşi poziţii relative faţă de punctul start. Secvenţele de ADNdc dintre secvenţele

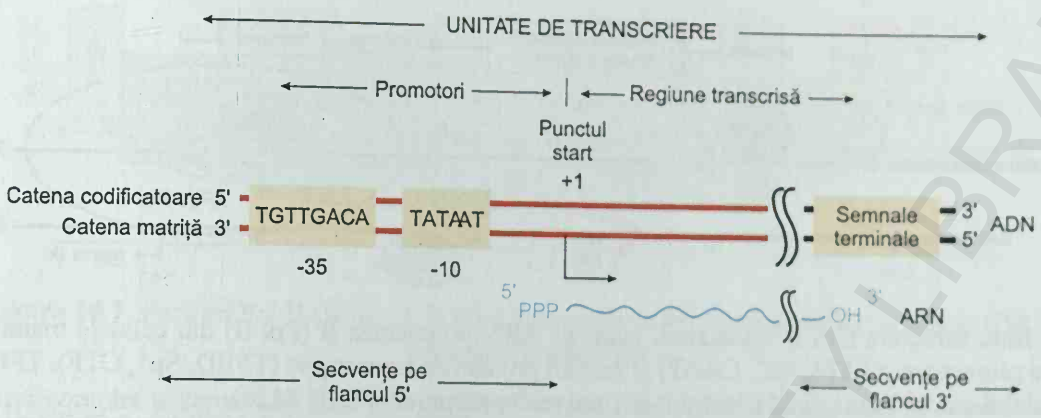


Figura 18.4. Componentele promotorului la care se asociază ARNP din *E. coli*. Cu culoare roșie sunt reprezentate elementele (secvențele) de pe flancul 5' iar cu culoare albastră molecula de ARN nou-sintetizată. Se observă faptul că nucleotidul de la capătul 5' al ARN este trifosforic.

consens diferă de la bacterie la bacterie ceea ce a determinat necesitatea existenței mai multor tipuri de subunități σ (σ_1, σ_2 etc.).

Secvențele care controlează transcrierea în celulele eucariote sunt de mai multe tipuri. Un tip determină **locul** de pe molecula de ADNdc unde va începe transcrierea. Un alt tip contribuie la mecanismele care controlează **frecvența** cu care are loc transcrierea.

Gena timidin kinazei (*tk*) din **virusul herpetic *simplex*** utilizează factori de transcriere ce aparțin celulelor mamiferului-gazdă în scopul derulării primelor etape ale exprimării genelor proprii. Enzima codificată de această genă catalizează reacția de fosforilare a dezoxitimidinei (*Figura 18.5*).

Această genă a fost găsită și în virusul *varicella zoster* și în virusul *Epstein Barr*. Gena conține un singur punct start de la care începe transcrierea a cărei secvență consens este situată cu 32 de nucleotide în amonte de punctul start. Această secvență consens conține secvența **TATAAAAG** care seamănă destul de bine cu secvența consens din caseta **TATA** aflată cu 10 nucleotide în amonte de punctul start în *E. coli*.

Mutația sau inactivarea casetei TATA reduce puternic desfășurarea transcrierii genelor care

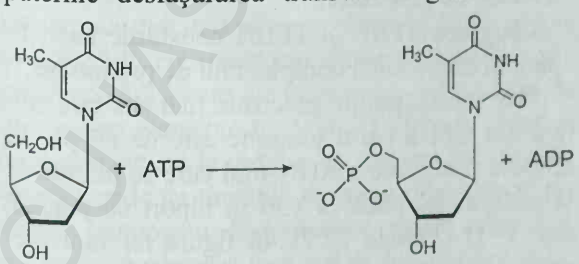


Figura 18.5. Reacția catalizată de enzima care este codificată de gena *tk*.

conțin această secvență consens. În celulele mamiferelor, caseta TATA este situată cu 25-30 de nucleotide în amonte de punctul start (+1) al transcrierii. Secvența consens conținută in elementul pe care îl numim caseta TATA este TATAAA. La om, la această casetă este asociată o proteină de 34 kDa, numită **TATA-binding protein (TBP)**, care este o subunitate a complexului **TFIID** (factorul de transcriere IID). Celelalte subunități ale TFIID sunt proteine numite **TBP-associated factors (TAFs).** Asocierea TFIID la secvența consens din caseta TATA constituie primul pas în formarea complexului de preinițiere al transcrierii din celulele mamiferelor. TBP se asociază la caseta TATA pătrunzând în șanțul minor al ADN (cei mai mulți factori de transcriere pătrund în șanțul major) și cauzează o deformare (încovoiere) cu 100° a duplexului. Această încovoiere facilitează interacțiunea TAFs cu alte componente ale complexului de inițiere. Deși are ca principală funcție participarea la formarea complexului de preinițiere bazat pe Pol II, TBP este de asemenea component important al complexelor de inițiere bazate pe celelalte polimeraze din celulele eucariote (Pol I și Pol III), deoarece se poate asocia cu seturile corespunzătoare TAFs, în ciuda faptului că niciunul din complexele cu Pol I și Pol III nu conțin casete TATA. În *Figura 18.6* sunt înfățișate elementele transcrierii (promotorul și elementele proximale la care sunt asociați factori de transcriere) care deservesc CPI bazat pe Pol II. Formarea CPI crează condițiile necesare declanșării transcrierii începând cu nucleotidul +1. Frecvența cu care are loc transcrierea este mărită (transcriere intensificată) de prezența elementelor (casetelor) **GC** și **CAAT** care

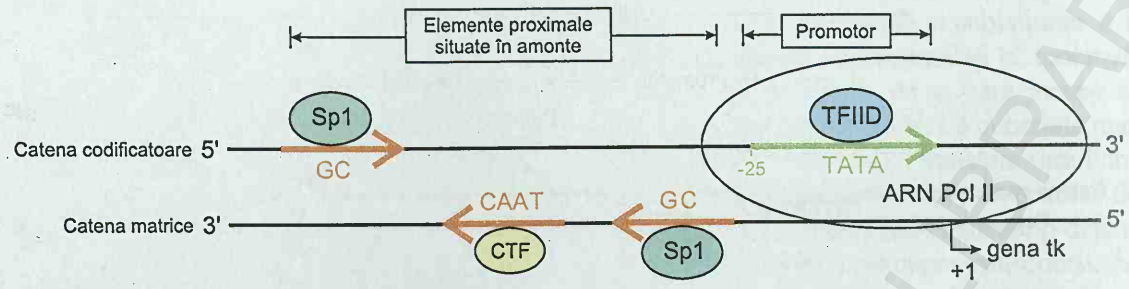


Figura 18.6. Structura CPI al transcrierii bazat pe ARN polimeraza II (Pol II) din celulele mamiferelor: secvenţe promotoare (TATA, GC, CAAT) şi factorii proteici de transcripţie (TFIID, Sp1, CTF). TFIID este principalul factor al Pol II, fiind constituit din mai multe subunităţi (TBP, TAFs).

devin active prin asocierea factorilor de transcriere proteici **Sp1** şi **CTF** (**C**AAT box **t**ranscription factor). În timp ce secvenţele consens din caseta TATA şi dintr-un element GC aparţin catenei codificatoare de ADN, celelalte elemente (CAAT şi celălalt GC) conţin secvenţe **antisens** care aparţin catenei matriţă de ADN.

Unor gene care codifică ARNm le lipseşte caseta TATA. În acest caz există elemente promotor suplimentare, secvenţa iniţiatoare **Inr** şi **elementul promotor în aval** (DPE), care direcţionează maşinăria de transcriere a Pol II către promotorii situaţi în amonte de punctul start pentru a iniţia transcrierea la locul potrivit. Elementul Inr conţine secvenţa consens TCA_{+1} G/T T T/C (A_{+1} indică primul nucleotid care se transcrie). Printre proteinele care se asociază la Inr pentru a direcţiona asocierea Pol II este TFIID. Promotorii care au atât casetă TATA cât şi Inr determină transcrieri mai viguroase decât promotorii care dispun numai de unul din aceste elemente. Secvenţa consens din DPE este A/GGA/TCGTG şi ea este plasată cu cca. 25 pb în aval de punctul start (+1). Subunităţile TAF ale TFIID se asociază la ambele elemente, Inr şi DPE. Distribuţia acestor elemente promotor în genele celulelor eucariote este reflectată de un studiu efectuat pe 200 de organisme eucariote: 30% conţin caseta TATA şi Inr, 25% conţin Inr şi DPE, 15% conţin toate cele 3 elemente şi 30% conţin numai Inr.

În general, dar nu exclusiv, elementele situate în amonte de punctul start al transcrierii determină frecvenţa cu care se realizează iniţierea transcrierii. Mutaţiile produse în aceste regiuni reduce frecvenţa start-ului transcrierii de 10-20 de ori.

Pentru a iniţia transcrierea, factorii proteici Sp1 şi CTF, prezentaţi în *Figura 18.6,* se asociază la elementele GC şi CAAT prin părţi ale lor numite **domenii de legare de ADN** (DNA binding domain = **DBD**). Frecvenţa iniţierii transcrierii este reglată prin două tipuri de interacţiuni:

- între factorii proteici (Sp1, CTF) şi ADN, care implică DBD;
- între factorii proteici (Sp1, CTF) şi celelalte componente ale maşinăriei de transcriere care sunt următoarele:
  - Pol II
  - factorii Pol II cum sunt **TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF** şi **TFIIH**
  - factorii co-reglatori cum sunt proteinele **Mediator** (Med). Asocierea Med la Pol II joacă acelaşi rol cu asocierea subunităţii σ la ARNP. Holoenzima Pol II este complexul format prin asocierea Med la Pol II. În celulele umane există mai mult de 30 de proteine Med
  - factorii de **remodelare** şi modificare a cromatinei.

Aceste interacţiuni implică regiuni ale Sp1 şi CTF distincte de DBD, numite **domenii de activare** (AD). Formarea complexului de bază al transcrierii începe cu asocierea TFIID la caseta TATA care induce interacţiunile amintite mai sus la al doilea punct, care, în detaliu sunt următoarele:

- asocierea TFIIA şi apoi a TFIIB la complexul complexul TFIID-promotor (TATA). Aceste asocieri formează un complex ternar strâns ataşat de situs-ul de iniţiere al transcrierii;
- complexul ternar format leagă complexul Pol II-TIIF de promotor;
- adăugarea TFIIE şi TFIIH constituie paşii finali ai constituirii complexului de preiniţiere.

Prin interacţiunile precizate mai sus este edificat un CPI a cărui lungime este de 60 pb. El acoperă o regiune a ADN-ului care se întinde de la poziţia -30 până la +30 în raport cu punctul start (+1) (*Figura 18.7*). În figură nu sunt prezentaţi cofactorii reglatori sau factorii de remodelare şi modificare ai cromatinei. Complexul

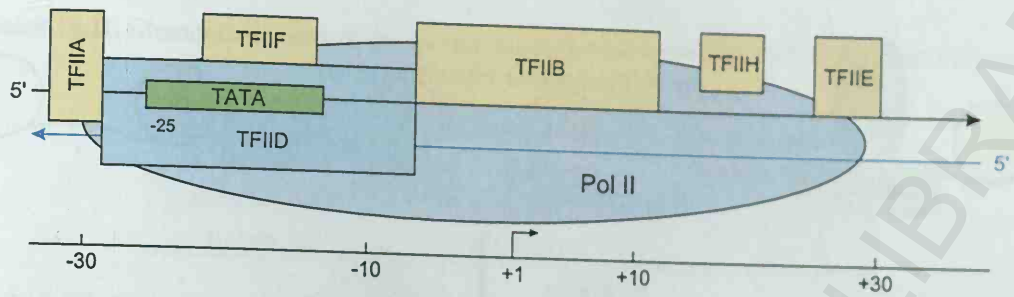


Figura 18.7. Factorii Pol II (A, B, D, F, H) şi poziţionarea aproximativă a lor în cadrul CPI din organismele eucariote.

este acum complet şi capabil să iniţieze transcrierea de la nucleotidul corect (+1). Genele lipsite de caseta TATA necesită aceiaşi factori. Poziţionarea corectă a complexului şi iniţierea exactă a transcrierii sunt asigurate de Inr sau DPE, aşa cum s-a menţionat şi mai sus.

Unele informaţii structurale privind maşinăria de transcriere au fost obţinute cu metode de cercetare a structurii biomoleculelor:

- prin difracţie de raze X s-a rezolvat molecula de Pol II singură [1I50], sistemul format din TBP asociat la caseta TATA în prezenţa TFIIA [1NVP] sau TFIIB [1D3U];
- prin microscopie electronică de înaltă rezoluţie au fost obţinute imagini ale complexelor TFIID şi TFIIH.

Promotorul şi elementele proximale situate în amonte (deseori numite **elemente *cis***) conferă fidelitate şi o anumită frecvenţă iniţierii transcrierii la nivelul unei gene. Caseta TATA necesită în mod strict o anumită poziţie în genă şi orientarea consens. Chiar şi mutaţia unei singure baze din elementele *cis* poate produce o scădere dramatică a afinităţii de asociere a factorilor de transcriere (TFIID/TBP, Sp1, CTF ş. a.), deseori numiţi **factori *trans***.

Elementele grupate într-o a treia clasă pot fie să crească, fie să descrească rata iniţierii transcrierii genelor eucariote. Aceste elemente se numesc **enhanceri** sau **silenceri**, în funcţie de efectul exercitat asupra sintezei ARN. Aceste elemente au fost găsite în diferite locuri, atât în amonte cât şi în aval faţă de punctul start al transcrierii. În unele cazuri au fost găsiţi enhanceri sau silenceri chiar şi în regiunile codificatoare ale unor gene. Sunt cazuri în care aceste elemente îşi exercită efectele chiar şi când sunt situate la distanţe de mii sau zeci de mii de nucleotide de unităţile de transcriere situate pe acelaşi cromozom. Surprinzător, există numeroşi enhanceri şi silenceri care pot să funcţioneze indiferent de orientarea lor. La unele secvenţe se poate asocia numai câte o proteină însă majoritatea asociază mai multe proteine diferite. Asocierea acestor proteine la elementele *cis* proximale şi distale reglează transcrierea ca răspuns la o largă gamă de semnale biologice. Filmuleţul de animaţie [anim-transcr1] prezintă într-o formă simplificată mecanismul transcrierii. O variantă mai dezvoltată, în care în plus se menţionează existenţa co-activatorilor şi a unor activatori prin mijlocirea cărora enhancerii sunt puşi în legătură cu co-activatorii precum şi a proteinei represoare care, prin asociere la un silencer blochează intervenţia activatorilor, este filmuleţul de animaţie [anim-transcr2].

18.1.3. Semnalele terminării transcrierii

Există puţine informaţii referitoare la semnalele terminării transcrierii la organismele eucariote. Totuşi, se ştie că aceste semnale sunt secvenţe situate departe, în aval de partea codificatoare a genei. De exemplu, la şoricei semnalul de terminare a transcrierii β-globinei apare mult în aval de situs-ul de poliadenilare. Formarea capătului 3' al ARNm, eveniment post-transcriere, este corelată cu evenimentele şi structurile răspunzătoare de iniţierea transcrierii. Ea depinde de una din subunităţile Pol II numită **domeniul repetitiv C-terminal** (carboxyl terminal repeat domain = **CTD**) care la *Saccharomyces cerevisiae* conţine 26 de unităţi iar la mamifere 52 de unităţi. Unitatea repetitivă este heptapeptidul cu secvenţa Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Moleculele de Pol II cărora le lipseşte CTD, nu pot să activeze transcrierea, celulele respective nefiind viabile. De fapt, Pol II la eucariote are o alcătuire mai complexă decât ARNP din procariote. În timp ce specia procariotă a polimerazei (holoenzima descrisă mai înainte) este un hexamer, $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$, specia eucariotă constă din 12 subunităţi dintre care două (cele mai mari) sunt omoloage subunităţilor β şi β' din procariote. După ce Pol II a parcurs regiunea codificatoare, inclusiv unitatea care codifică capătul 3' al transcrip-

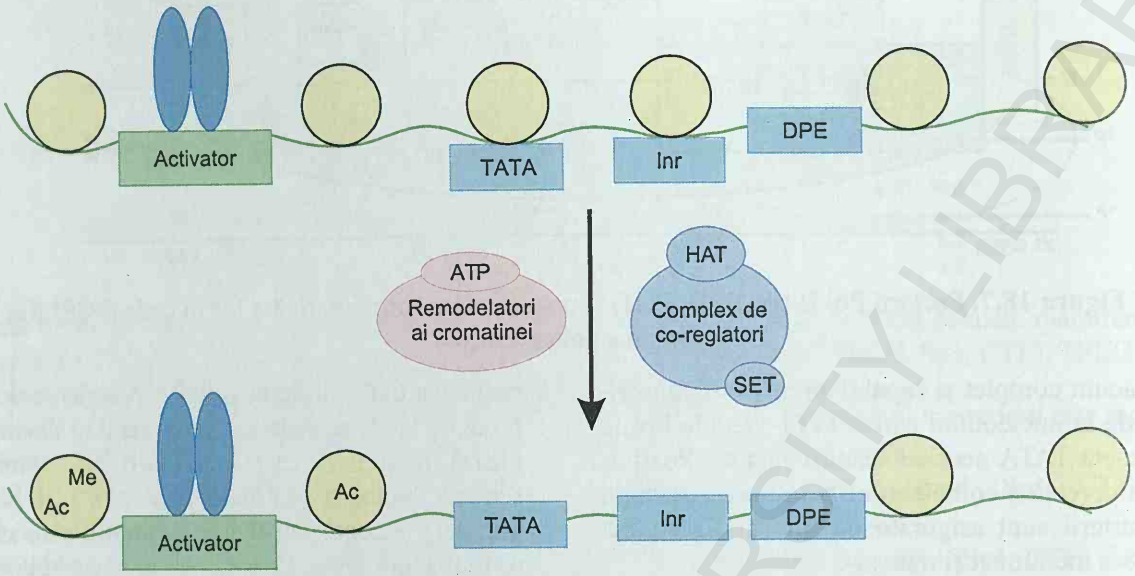


Figura 18.8. Modificările epigenetice ale nucleozomilor şi componentei histonice a acestora. Explicatii în text.

tului, intervin **ARN endonucleazele** care clivează transcriptul primar, iar noul capăt 3' este poliadenilat în nucleoplasmă. Este de notat faptul că CTD, prin caracterul său multifuncţional – el interacţionează cu numeroase enzime care prelucrează transcriptul şi cu proteine nucleare de transport – cuplează iniţierea transcrierii cu fazele terminale ale ei şi cele de după terminare (splicing-ul ARNm, formarea capătului 3' şi transportul către citoplasmă). Acest cuplaj este modulat prin activarea/dezactivarea Pol II prin fosforilarea/defosforilarea unor radicali de serină şi treonină din CTD. Fosforilarea/defosforilarea CTD este strict necesară tuturor etapelor de transcriere şi post-transcriere, de la *promoter clearance* până la prelucrarea ARNm.

18.1.4. Reglarea accesibilităţii promotorilor

Un aspect important al iniţierii este acela că la unele gene eucariotice maşinăria de transcriere (Pol II + factorii de transcriere etc.) nu poate accesa secvenţele promotor (TATA-Inr-DPE) deoarece aceste elemente sunt mascate de nucleozomi. Numai după asocierea factorilor de transcriere la elementele existente în amonte de promotor (cum ar fi de exemplu un enhancer) are loc recrutarea factorilor co-reglatori de remodelare şi modificare a cromatinei (Swi/Snf, SRC-1, p300/CBP, P/CAF) care induc „evacuarea" nucleozomilor prin care promotorul este adus în stare „deschisă". Îndată ce promotorul este deschis, Pol II şi alte proteine se pot asocia la promotor pentru a iniţia transcrierea genei care codifică ARNm. Asocierea activatorilor şi co-reglatorilor controlează modificările covalente ale histonelor din nucleozomi din regiunea promotorului şi prin aceasta este mărită sau micşorată tendinţa de asociere a componentelor CPI la o genă dată. Adică, un activator asociat la un enhancer este în măsură să interacţioneze cu factori ATP-dependenţi de remodelare a cromatinei şi cu co-reglatori modificatori ai cromatinei. Cei din urmă modifică covalent histonele prin reacţii de acetilare (Ac), folosind acetilaze ale histonelor (HAT), sau prin reacţii de metilare (Me), folosind metilaze (SET). *Figura 18.8* înfăţişează schematic modificările covalente şi evacuarea nucleozomilor de către co-reglatori. Luate împreună, aceste acţiuni co-reglatoare (plus metilarea ADN) constituie aşa-numitele **modificări epigenetice**. Ele permit asocierea la ADN a unor **trans-activatori** care facilitează formarea CPI şi iniţierea transcrierii. Mutaţiile ce afectează proteinele care catalizează modificarea covalentă a histonelor (**code writers**) sau a proteinelor care se asociază diferenţiat la histonele modificate (**code readers**) pot conduce la boli umane.

18.1.4.1. Activatori şi co-reglatori ai transcrierii

Dacă iniţial s-a crezut că TFIID este o singură proteină şi anume TBP, ulterior s-a demonstrat că TFIID este un complex constituit din TBP şi 14 TAFs. TBP poate sprijini transcrierea bazală însă nu şi transcrierea intensificată care necesită activatori cum sunt Sp1 (legat la elementele consens şi antisens GC) şi CTF (legat la elementul

Tabelul 18.II. Elemente de control din genele mamiferelor transcrise de Pol II şi factorii proteici (activatori) care se asociază de ele.

Element	Secvenţa consens	Activator
Caseta TATA	TATAAA	TBP/TFIID
Caseta CAAT	CCAATC	CTF
Caseta GC	GGGCGG	Sp1

Tabelul 18.III. Componentele bazale, activatorii şi co-reglatorii transcrierii din celulele mamiferelor.

Clasa	Componente
Componente bazale	TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH
Activatori	Sp1, CTF
Co-reglatori	TAFs (TBP + TAFs = TFIID), Med, remodelatori şi modificatori ai cromatinei

CAAT). Pe de altă parte, TFIID poate sprijini atât transcrierea bazală cât şi cea intensificată cu concursul activatorilor (Sp1, CTF ş.a.) şi a co-reglatorilor (Med, modificatori şi modelatori de cromatină ş.a.). Întrucât TAFs sunt necesari pentru acţiunea activatorilor, sunt incluşi în grupul co-reglatorilor. Uneori coreglatorilor li se mai spun co-activatori. În *Tabelul 18.II* sunt prezentate elementele de control (casetele şi secvenţele consens ale lor) aflate în genele celulelor de mamifere transcrise de Pol II. În *Tabelul 18.III* sunt prezentate cele 3 clase ale factorilor implicaţi în transcrierea ARNm componentele bazale, activatorii şi coreglatorii.

18.2. Prelucrarea transcriptelor primare

În organismele procariote transcriptele primare ale genelor care codifică ARNm încep să servească ca matriţe de traducere încă înainte ca transcrierea să se încheie. Această suprapunere a celor două procese, transcrierea şi traducerea, este posibilă în organismele procariote deoarece transcrierea nu este compartimentalizată în nucleu, aşa cum se întâmplă în organismele eucariote. Prin urmare, la procariote transcrierea şi traducerea sunt cuplate. Aproape toate transcriptele primare din celulele eucariote suferă o importantă prelucrare care se produce în intervalul dintre sinteza ARNm, microARN sau a unor componente ale maşinăriei de traducere (ARNr, ARNt) şi participarea acestora la traducere. Prelucrarea ARN începe în nucleu şi se integrează într-o succesiune de evenimente foarte coordonată din care mai fac parte transcrierea şi transportul ARN în afara nucleului.

18.2.1. Splicing-ul transcriptelor primare

În celulele umane există co-activatorul (co-reglatorul) proteic de transcriere **P/CAF** care se ştie că face legătura între activarea transcrierii şi prelucrarea ARN prin recrutarea unui complex numit **TREX** (transcriere-export). TREX corelează complexul de elongare al transcrierii, maşinăria de ***splicing*** a transcriptului primar şi exportul ARN prin porii nucleari pentru a ajunge în citoplasmă. Iniţial P/CAF a fost identificat ca fiind o proteină asociată cu **CREBP** (cAMP-response element-binding protein). Adică P/CAF este o proteină care se ataşează de o altă proteină de asociere. Această nomenclatură este consecinţa faptului că definirea proteinelor din celule se bazează pe interacţiunile dintre ele. Mutaţii în gena care codifică proteina CREBP (*CREBP*) cauzează **sindromul Rubinstein-Taybi**, o boală ereditară autozomală dominantă caracterizată prin statură scundă şi unele dificultăţi de învăţare. Bolnavii prezintă un risc crescut pentru leucemii şi limfoame.

Aşa cum s-a arătat în subcapitolul *„Organizarea structurală a ADN"*, intercalate între porţiunile de ADN codificatoare de aminoacizi (exoni) există lungi secvenţe care nu codifică informaţie şi nu se transcriu sau traduc, numite introni. Ei există în multe dar nu în toate moleculele de ARNm din organismele eucariote superioare. Intronii (de fapt secvenţele codificate de introni) sunt eliminaţi din transcript prin clivare, iar exonii (de fapt secvenţele codificate de exoni) sunt conectaţi între ei. Aceste procese au loc în nucleu, iar apoi, molecula rezultantă de ARNm iese în spaţiul citoplasmatic unde va participa la traducere. Ţinând cont că de obicei un exon codifică un domeniu de activitate sau un

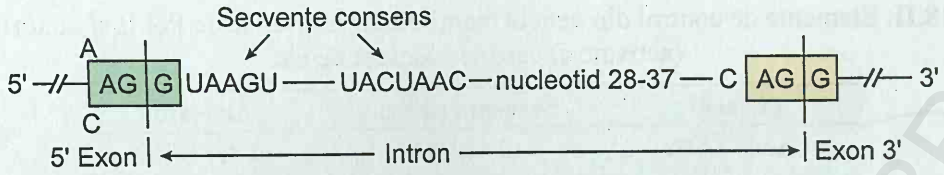


Figura 18.9. Splicing-ul transcriptului primar.

modúl funcţional al unei proteine, se pare că procesele de clivare, eliminare a intronilor şi reunire a exonilor sunt un mijloc eficient de grupare a informaţiei genetice permiţând organismelor să testeze rapid combinaţia nou-formată de domenii funcţionale ale proteinei.

Îndepărtarea intronilor este realizată de un complex numit „**spliceosome**" în alcătuirea căruia intră:

- transcriptul primar,
- 5 molecule de ARN nuclear mic (ARNnm): U1, U2, U4, U5 şi U6,
- mai mult de 60 de proteine care conţin „motivele" conservate „arginină-asparagină-prolină" şi „serină-arginină". Împreună, cele 5 molecule de ARNnm şi proteinele care conţin motivele menţionate constituie ribonucleoproteina nucleară mică sau **complexul ARNnm** (small nuclear ribonucleoprotein - **snRNP**).

Complexul ARNnm se formează înainte de a interacţiona cu transcriptul primar şi joacă un rol în poziţionarea exonilor şi intronilor ARN pentru producerea *splicing*-ului. *Splicing*-ul începe cu clivarea joncţiunii exon-intron de la capătul 5' al intronului. A doua clivare se produce la nivelul joncţiunii intron-exon de la capătul intronic 3' (*Figura 18.9*). Un rol important în efectuarea clivărilor îl joacă cele două joncţiuni cu secvenţa AGG ale căror defecţiuni pot genera boală, aşa cum se arată mai jos. După eliberarea intronului, capătul 3' al exonului din partea stângă a *Figurii 18.9* este legat la capătul 5' al exonului din dreapta pentru a forma o secvenţă exonică continuă. Un rol important în aducerea intronului clivat la o formă uşor de eliminat îl au secvenţele consens UAAGU şi UACUAAC din structura acestuia.

Prelucrarea moleculelor de ARNm este o modalitate de reglare a exprimării genice şi, existenţa unor mecanisme alternative de *splicing*, dependente de tipul de ţesut, este o dovadă. Lanţul de evenimente prin care se produce *splicing*-ul exon-intron, exemplificat mai înainte, se desfăşoară într-o anumită ordine care depinde de gena dată. Pe parcursul *splicing*-ului, cu participarea a numeroase proteine implicate, se formează structuri complexe ale ARN care fac posibilă schimbarea acelei secvenţe de evenimente, adică generarea unor molecule diferite de ARNm. În mod similar, folosirea unor situs-uri alternative de poliadenilare, prin care se marchează al doilea capăt de clivare (3') al ARN în cadrul prelucrării, se soldează cu diversificarea produşilor acestei prelucrări. *Splicing*-ul pe căi diferite dependente de ţesut poate fi realizat şi prin implicarea promotorilor distincţi (prin poziţia ocupată) sau a altor elemente de control.

De exemplu, gena pentru glucokinază (*GK*), care catalizează fosforilarea glucozei în ficat şi pancreas, conţine seria de exoni 2-10. Secvenţele exonilor 2-10 din hepatocite şi din celulele β ale insulelor lui Langerhans din pancreas sunt identice. Cele două tipuri de celule aparţin ţesuturilor primare în care este exprimată această enzimă, însă, exprimarea genei *GK* este reglată pe căi diferite în cele două ţesuturi. În ficat, promotorul şi exonul 1L sunt situaţi aproape de exonii 2-10, iar exonul 1L este legat direct de exonul 2, aşa cum se vede în *Figura 18.10*. Din contră, în celulele β pancreatice promotorul şi exonul 1B sunt situaţi departe, la cca. 30 kpb în amonte faţă de poziţia promotorului şi a exonului 1L din hepatocite. În acest caz, marginea 3' a exonului 1B

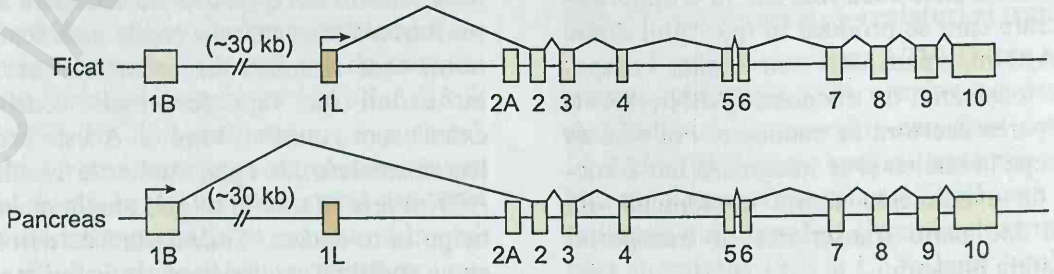


Figura 18.10. Reglarea exprimării genei codificatoare a enzimei glucokinază (*GK*) în ficat şi pancreas.

este legată de marginea 5' a exonului 2. Promotorul şi exonul 1L din ficat (nu şi din pancreas) sunt eliminaţi în cursul *splicing*-ului. Prin urmare, existenţa unor promotori distincţi permite **pattern**-uri diferite (dependente de ţesut) ale exprimării unei gene particulare (ARNm).

Erorile de splicing pot cauza boli. Una din formele **talasemiei β**, o boală în care gena care codifică protomerul β al hemoglobinei este sever subexprimată, este rezultatul unei mutaţii, substituţia unui nucleotid din joncţiunea exon-intron prin care este împiedicată eliminarea intronului. Diminuarea sau absenţa sintezei protomerului β în acest caz este o consecinţă a faptului că secvenţa ARNm, ajuns în stadiul de traducere, este alterată de această eroare de *splicing*.

18.2.2. Prelucrarea capetelor 5' şi 3' ale ARNm

Aşa cum s-a menţionat anterior, imediat după sinteză, moleculele de ARNm sunt protejate la capătul 5' cu **7-metil-GTP**. Această modificare se produce în nucleu înainte ca molecula de ARNm să fie transportată în citoplasmă. După ce ARNm a ajuns în citoplasmă unele adenozine sunt metilate în poziţiile 2'-hidroxi şi N^7. Un alt pas al prelucrării post-transcriere din celulele mamiferelor este **poliadenilarea**, adică adăugarea la capătul 3' al ARNm a unor prelungiri de poliAMP, notată pe scurt **poliA**. Pentru aceasta, la început molecula este clivată cu cca. 20 de nucleotide în aval de o secvenţă de recunoaştere (AAUAA). Apoi, enzima poliA polimeraza adaugă prelungirea poliA care se poate extinde până la 200 de subunităţi adenilil (AMP = acid adenilic). Aceste prelungiri par să protejeze capătul 3' al ARNm de atacul 3' → 5' al ARN exonucleazei. După ieşirea din nucleu, enzimele citoplasmatice mai pot să adauge sau să elimine subunităţi adenilil. Aceste modificări au fost asociate cu alterarea stabilităţii sau capacităţii de traducere a ARNm.

Dimensiunile unor molecule de ARNm citoplasmatic, chiar şi după îndepărtarea prelungirilor de poliA, sunt considerabil mai mari decât dimensiunile necesare codificării proteinelor. Acest lucru se datorează existenţei unor regiuni ne-traductibile (ne-codificatoare de proteine) ale ARNm care se găsesc atât în amonte de capătul 5' (5'-NTR) cât şi în aval de capătul 3' (3'-NTR) ale regiunilor codificatoare de proteine; cele mai lungi secvenţe se găsesc la capătul 3'. 5'-NTR şi 3'-NTR sunt implicate în prelucrarea, transportul, degradarea şi traducerea ARNm, dar mecanismele sunt încă neelucidate. Moleculele de **microARN** (miARN) îşi exercită acţiunea asupra unor secvenţe din 3'-NTR.

18.2.3. Micro-ARN

Majoritatea moleculelor de miARN sunt rezultatul acţiunii de transcriere exercitată de ARN Pol II prin care se formează lungi precursori de ARN dublu catenar (sute sau mii de pb) numiţi **pri-miARN**. Ca şi precursorii de ARNm, moleculele de pri-miARN sunt protejate (capping) la capătul 5' şi poliadenilate la capătul 3'. Gena care codifică un miARN posedă un promotor, regiunea codificatoare şi semnale de poliadenilare/terminare. Moleculele de pri-miARN conţin câte o buclă în formă de agrafă care conţine cca. 40 de nucleotide cu rol în recunoaştere. În nucleu, nucleaza **Drosha** este asociată cu proteina **Pasha** [2YT4] numită şi DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8), pentru a forma complexul numit „microprocessor". Proteina Pasha recunoaşte bucla din structura pri-miARN şi „ajustează" secvenţele de la capetele 5' şi 3' ale pri-miARN dând naştere unor molecule duplex mai mici numite **pre-miARN**. Aceste molecule traversează membrana nucleară prin porii creaţi de proteina **exportin-5** pentru a ieşi în citoplasmă. Această proteină este codificată de gena *XPO5* (cu fonetică sugestivă) şi aparţine unei familii de carioferine care mediază transportul din nucleu în citoplasmă a mai multor proteine. În citoplasmă moleculele de pre-miARN sunt „ajustate" în continuare sub acţiunea endoribonucleazei **Dicer** [2QVW]. Această enzimă aparţine familiei III a ribonucleazelor care clivează ARNdc şi pre-miARN (miARN) pentru a rezulta scurte fragmente de ARNdc numite **siARN** (small interfering RNA) formate din 20-25 pb. În continuare duplexul miARN este despiralat şi una din cele 2 catene este selectată şi încorporată în complexul **RISC** (RNA-induced silencing complex) pentru a forma molecula de miARN matură (funcţională) (*Figura 18.11*). Filmuleţul de animaţie [animmiARN] înfăţişează etape ale biogenezei siARN şi miARN. Proteina enzimatică **argonaut** este component al RISC (nereprezentată în figură) fiind responsabilă de fenomenul atenuării genetice cunoscut şi sub numele de **interferenţa ARN**. Structura cristalografică a argonaut-ului din *Pyrococcus furiosus* este codificată [1UO4].

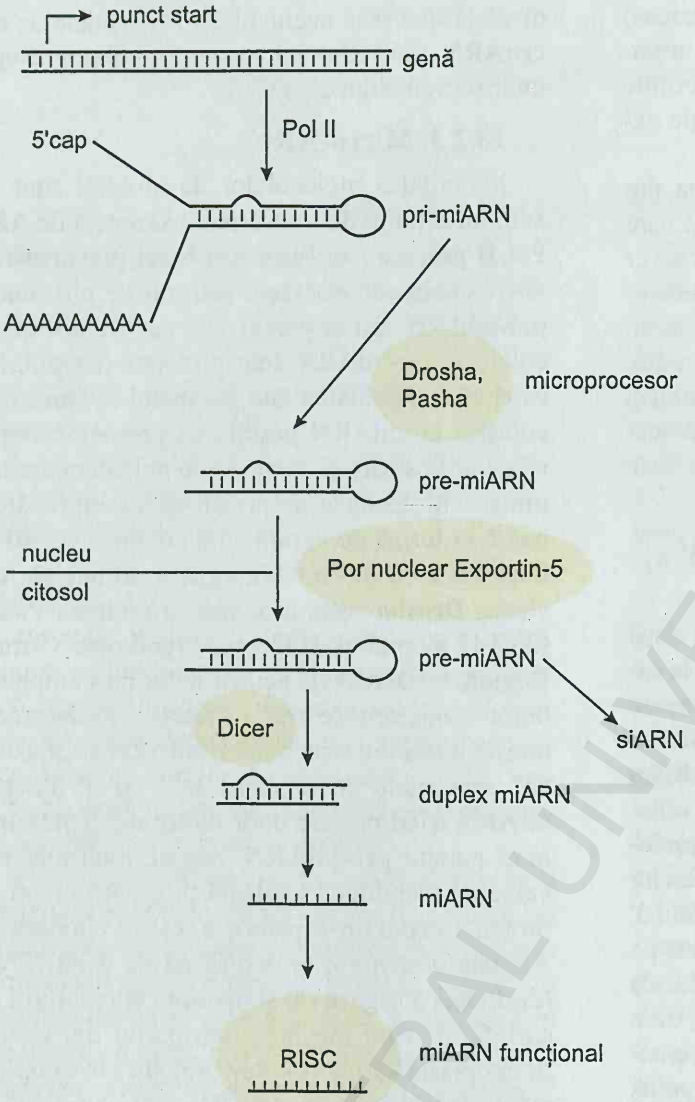


Figura 18.11. Biogeneza miARN şi siARN iniţiată prin transcriere cu Pol II şi continuată în 2 compartimente ale celulelor umane, nucleu şi citosol.

Pe măsură ce sunt dezvăluite mecanismele prin care moleculele de miARN sunt implicate în funcţionarea normală a celulelor eucariote, au apărut date privind relaţiile dintre dereglările acestor mecanisme şi diferite boli. După ce acum câţiva ani cercetarea a fost îndreptată în special către cancer şi neuroştiinţe, începând cu 2007 aria de interes s-a lărgit cu noi domenii cum sunt bolile cardiovasculare, virologia, biologia celulară, importante fonduri fiind alocate dezvoltării şi comercializării metodelor de diagnostic şi tratament pe bază de miARN. Este de notat existenţa unei baze de date publice la adresa web www.mir2disease.org. Există indicii că unele tipuri de miARN inhibă factorul de transcriere E2F1 care, aşa cum s-a arătat în secţiunea „Reglarea replicării şi relaţia cu cancerul", este esenţial pentru tranziţia $G_1 \rightarrow S$ din cadrul ciclului celular. Prin măsurarea activităţii genelor codificatoare de miARN se poate face distincţie între anumite tipuri de cancere. Cunoaşterea profilului de activitate genetică a miARN la pacienţii cu **leucemie limfocitică cronică** permite determinarea formei de cancer de care ei suferă: lentă sau agresivă.

18.2.4. Editarea ARNm

Conform dogmei centrale a biologiei moleculare, pentru o genă dată şi un produs genetic există o relaţie liniară între secvenţa codificatoare din ADN, secvenţa ARNm şi secvenţa proteinei codificate. Totuşi, recent au fost semnalate excepţii de la această dogmă. Informaţia codificatoare poate fi modificată la nivelul ARNm printr-un proces numit **editarea** ARN. De exemplu, în ficat transcrierea unei gene, *apoB*, dă naştere unui ARNm care participă la sinteza unei proteine cu masa de 100 kDa numită apolipoproteina **B100** (ApoB100). În intestin, aceeaşi genă codifică un transcrip primar; totuşi, o citidin dezaminază converteşte citozina în uracil, adică codonul CAA din ARNm în codonul UAA. Prin această conversie un codon care codifică glutamina devine un semnal de terminare a traducerii (codon stop) produsul acesteia fiind o proteină cu masa de 48 kDa numită apolipoproteina **B48** (ApoB48). ApoB100 şi apoB48 au funcţii diferite în cele două ţesuturi. Alte exemple de editare se bazează pe înlocuirea glutaminei (CAA) cu arginina (CGA) din structura receptorului glutamatergic.

18.2.5. Prelucrarea ARN ribosomal şi ARN de transfer

Un ribozom este o nucleoproteină citoplasmatică care, prin unele componente ale sale, se poate integra în maşinăria de biosinteză a proteinelor condusă informaţional de o moleculă de ARNm matriţă. Ribozomul este suportul în care ARNm şi moleculele de ARNt interacţionează pentru a realiza traducerea, adică conversia informaţiei genetice, rezultate prin transcrierea unei gene, în lanţul de aminoacizi al proteinei. În

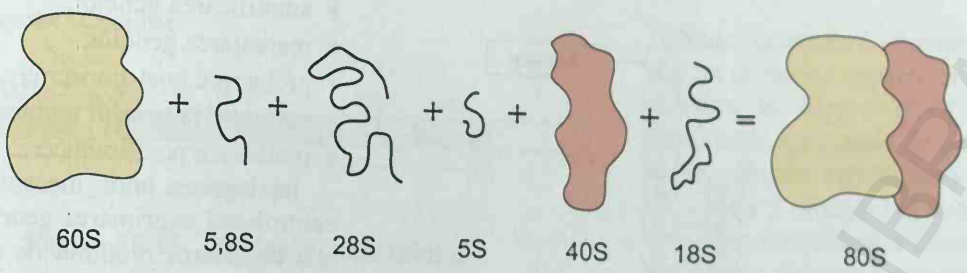


Figura 18.12. Compoziţia ribozomului din celulele eucariote. Nu sunt evidenţiate polipeptidele ribozomale.

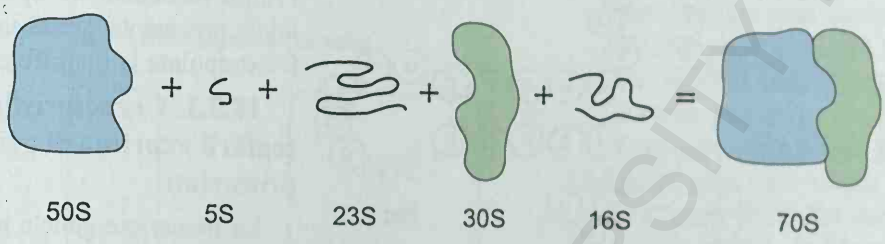


Figura 18.13. Componentele ribozomului din celulele procariote.

timpul sintezei proteice mai multe particule ribozomale se asociază pentru a constitui împreună cu molecula de ARNm ansamblul supramolecular numit **polizom**. Ribozomul din celulele mamiferelor are masa moleculară de cca. 4,2 MDa şi coeficientul de sedimentare în câmp centrifugal 80S (S = unităţi Svedberg). Acest ribozom conţine 2 subunităţi nucleoproteice, una mare (60S) şi una mică (40S). Subunitatea 60S conţine ARNr 5S, 5,8S şi 28S precum şi peste 50 de polipeptide. Subunitatea 40S conţine ARNr 18S şi cca. 30 de polipeptide (*Figura 18.12*). Trebuie menţionat că coeficientul de sedimentare al acestuia (80S) nu este suma aritmetică a coeficienţilor subunităţilor componente deoarece nu există o relaţie liniară între aceşti coeficienţi. Altfel spus, coeficientul de sedimentare nu se bucură de proprietatea de aditivitate.

Pentru comparaţie, în *Figura 18.13* este prezentată compoziţia ribozomului din celulele procariote.

Cu excepţia ARNr 5S, care este transcris independent, toate moleculele de ARNr rezultă prin prelucrarea unei molecule precursoare 45S, sintetizată în nucleol. Tot în nucleol, 45S este scindată în 3 molecule de ARNr (28S, 18S şi 5,8S) care se vor regăsi în subunităţile ribozomale din citoplasmă. Sute de copii ale genelor acestor molecule de ARNr se găsesc în fiecare celulă deoarece moleculele de ARNr sunt produşi finali, adică o genă poate codifica sinteza unei singure molecule de ARNr (nu a mai multor copii). Pentru comparaţie, o moleculă de ARNm poate asigura sinteza câtorva zeci de mii de copii ale unei proteine. Lipsa de amplificare în sinteza ARNr face necesară prezenţa unui mare număr de gene codificatoare în fiecare celulă şi o mare viteză de transcriere, sincronizată cu viteza de proliferare celulară. Şi moleculele de ARN de transfer (ARNt) sunt sintetizate ca precursori care au secvenţe adiţionale la capetele 5' şi 3' şi conţin ARNt matur. Numărul moleculelor de ARNt care conţin introni este mic.

Moleculele de ARNt mature variază în lungime între 74 şi 95 de nucleotide fiind generate prin prelucrarea moleculelor precursoare pomenite mai sus. O moleculă de ARNt serveşte ca **adaptor** pentru traducerea informaţiei conţinută în secvenţa de nucleotide a ARNm. În fiecare celulă există cel puţin 20 de specii de ARNt, cel puţin una (deseori mai multe) pentru fiecare din cei 20 de aminacizi codificaţi genetic, adică implicaţi in traducere. Structura primară, adică secvenţa de nucleotide, a unei molecule de ARNt permite plierea catenei şi împerecherea intracatenară, cu respectarea principiului complementarităţii bazelor, pentru a edifica o structură secundară care, proiectată în plan seamănă cu o frunză de trifoi (*Figura 18.14*). Toate moleculele de ARNt conţin 4 braţe:

- braţul **acceptor** care se termină cu nucleotidele CMP-CMP-AMP. Aceste nucleotide sunt adăugate în cursul prelucrării post-transcriere de către o enzimă transferază specifică. Aminoacidul corespunzător activat de acest ARNt este ataşat printr-o legătură esterică la gruparea 3'-OH a AMP terminal;
- braţul **D** (D = dihidrouracil) care conţine 2 dihidrouridine;

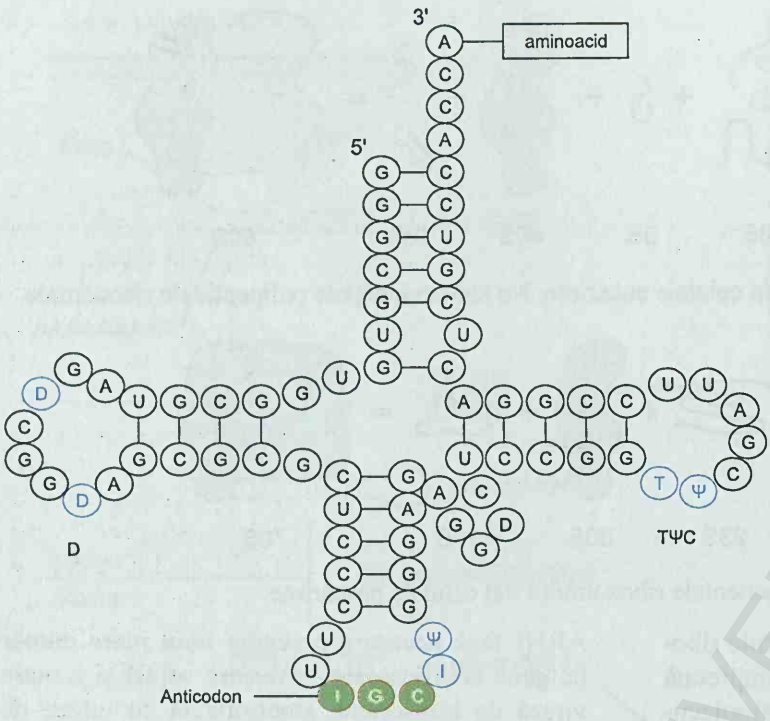


Figura 18.14. Structura secundară a ARNt din celulele procariote. Cu culoare albastră sunt scrise baza azotată (dihidrouracil) şi nucleozidele (timidină, pseudouridină şi inozină) improprii moleculelor de ARN care, de altfel, dau numele braţelor ARNt. Pe fond verde sunt notate ribonucleozidele anticodonului (I-G-C adică inozină-guanozină-citidină). Inozina din secvenţa anticodonului joacă un rol important în recunoaşterea codonului.

- braţul **TΨC** (timidină-pseudouridină-citidină) care conţine pseudouridina, un nucleozid aparte;
- braţul **anti-codon** prin care aminoacil-ARNt se ataşează de codonul complementar din secvenţa ARNm. În secvenţa acestui braţ mai există pseudouridină (Ψ) şi inozină (I = ribonucleozidul bazei improprii hipoxantină).

18.3. Reglarea exprimării genelor

Organismele se adaptează la schimbările de mediu prin modificarea exprimării genelor care deseori constă în modularea transcrierii acestora. Această modulare se poate realiza prin asocierea unor proteine specifice la diferite regiuni ale ADN-ului existente în genele controlate prin care transcrierea este activată sau inhibată. Exprimarea genetică dependentă de ţesut este tot un rezultat al controlului transcrierii. Pe de altă parte reglarea exprimării genelor poate fi un rezultat al influenţei hormonilor, ionilor metalelor grele sau altor substanţe chimice. În general, exprimarea genelor poate fi modulată prin:

- controlul la nivelul transcrierii,
- amplificarea genelor,
- rearanjarea genelor,
- prelucrare post-transcriere,
- controlul la nivelul traducerii,
- prelucrare post-traducere.

Înţelegerea unor mecanisme care controlează exprimarea genelor a permis elucidarea modului de acţiune al hormonilor şi substanţelor terapeutice. Printre mecanismele aplicabile la celulele procariote există unele care pot fi extrapolate la mamifere.

18.3.1. Caracteristici ale reglării exprimării genelor la procariote

La procariote genele implicate într-o cale metabolică sunt deseori plasate într-o înşiruire liniară numită **operon**, cum este, de exemplu, operonul *lac*. Operonii pot fi reglaţi de un singur promotor sau de o întreagă regiune reglatoare. **Cistronul** este cea mai mică unitate de exprimare genică. Totuşi, unele enzime şi proteine cu alte funcţii sunt compuse din două sau mai multe subunităţi diferite. În acest caz conceptul „o genă – o enzimă" nu este în mod necesar adevărat. Întrucât cistronul este unitatea care codifică genetic subunitatea unei proteine, este mai adecvat conceptul „un cistron – o subunitate proteică". O moleculă de ARN care codifică mai mult decât o singură proteină poate fi numită un **ARNm policistronic**. De exemplu, ARNm policistronic al operonului *lac* din ARNm este tradus în 3 proteine, aşa cum se va arăta în cele ce urmează. Operonii şi ARNm policistronic se află în bacterii, nu şi în celulele eucariote.

O **genă inductibilă** este gena a cărei exprimare, de obicei scăzută, creşte ca răspuns la acţiunea unui **inductor** (activator) despre care spunem că este un semnal reglator pozitiv. Din contră, o genă care are o viteză de transcriere bazală mare este supusă acţiunii unui **represor** (inhibitor).

Exprimarea unei gene este **constitutivă** atunci când gena este exprimată cu o viteză aproximativ constantă şi nu se cunoaşte că ar fi supusă reglării. Termenul se extinde asupra unei gene despre care se spune că este „domestică". Ca rezultat al unei mutaţii produsul unei gene inductibile poate deveni produs al exprimării constitutive. În acest caz, mutaţia este constitutivă.

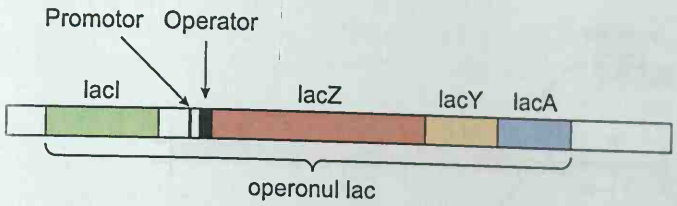


Figura 18.15. Topologia operonului *lac*.

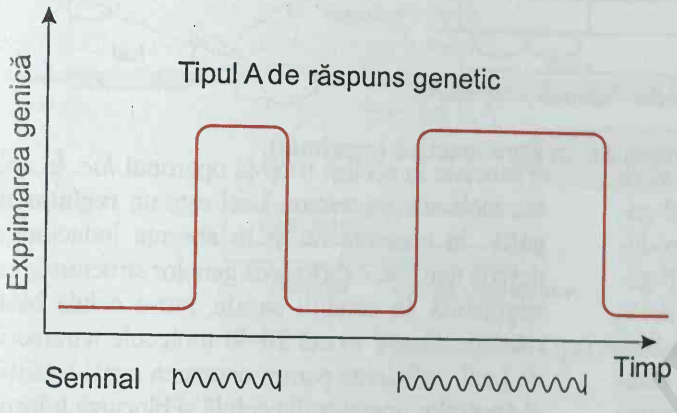


Figura 18.16. Tipul de răspuns genetic temporal al operonului *lac*.

18.3.1.1. Operonul *lacZYA*

În 1961 François Jacob și Jacques Monod au descris **modelul operonului**. Ipoteza propusă s-a bazat pe observații privind reglarea metabolizării lactozei de către bacteriile intestinale *E. coli*. Cei doi cercetători, împreună cu André Lwoff, au fost laureați in 1965 cu Premiul Nobel (Fiziologie sau Medicină) „pentru descoperirile privind controlul genetic al sintezei enzimelor și virusurilor".

Mecanismul molecular al reglării genelor implicate în acest metabolism este unul din cele mai binecunoscute mecanisme de reglare a exprimării genelor. **β-Galactozidaza** hidrolizează β-galactozidul numit lactoză pentru a rezulta galactoză și glucoză. Glucoza este principalul „aliment" al bacteriilor *E. coli*. Gena structurală (gena care codifică o proteină) a β-galactozidazei (notată de autori *lacZ*) este grupată cu genele responsabile pentru permeabilizarea membranei bacteriene pentru lactoză (o permează codificată de gena *lacY*) și pentru enzima tiogalactozid transacetilază (*lacA*). Genele structurale ale celor 3 enzime sunt asociate fizic cu două secvențe, **promotorul *lac*** și **operatorul *lac***, din structura unei regiuni reglatoare situată *în amonte*. Toate acestea împreună cu o genă inhibitoare (*lacI*) care codifică proteina **represor (LacI)**, constituie, după unii autori, **operonul *lac***, reprezentat în *Figura 18.15*. După alți autori, operonul *lac* nu include gena *lacI*, deoarece aceasta are un promotor separat. Aranjamentul înfățișat în *Figura 18.15* al genelor structurale, precedate de genele reglatoare, permite **exprimarea coordonată** a celor 3 enzime implicate în metabolizarea microbiană a lactozei. Genele structurale (cistroni) sunt transcrise într-o moleculă de ARNm policistronic care conține mai mulți codoni **start** (AUG) și **stop** (UAA), independenți unii de alții. Enzimele produse prin traducerea policistronilor de ARNm sunt sintetizate separat una de alta, nu prin prelucrarea unui singur precursor proteic mare. Simbolul unei gene, în notația introdusă de Monod și Jacob, se bazează pe o prescurtare formată din 3 litere scrisă cu minuscule italice, de exemplu, gena *lacI*. În notarea unei proteine se folosește simbolul genei codificatoare scris normal cu inițială majusculă, de exemplu, proteina LacI. Uneori, simbolul proteinei se scrie cu *bold*, **LacI**.

În prezent se consideră că în general o genă conține, pe lângă regiunea care codifică transcriptul primar, secvențe reglatoare care controlează transcrierea regiunii codificatoare. Atunci când celulele de *E. coli* sunt cultivate pe un mediu care conține numai lactoză, sau un amestec de lactoză cu cantități neglijabile de glucoză, sunt realizate condițiile de-reprimării sintezei celor 3 enzime ale căror activități sunt crescute de 100 până la 1000 de ori față de situația în care bacteriile sunt cultivate pe un mediu cu suficientă glucoză. Acesta este un răspuns genetic temporal de tip A (*Figura 18.16*) caracterizat de faptul că pe durata prezenței semnalului activator (**inductor**) exprimarea genică se menține ridicată, iar la dispariția inductorului exprimarea revine imediat la valoarea bazală. În cazul particular al operonului *lac*, exprimarea β-galactozidazei atinge valoarea maximă, adică se produce **inducția enzimatică**, în 5-6 minute de la momentul adăugării lactozei. Numărul moleculelor de enzimă poate ajunge la 5000/celulă adică de 1000 de ori mai multe decât în condiții bazale.

Atunci când bacteriile (*E. coli*) sunt expuse la un amestec, în care lactoza și glucoza sunt în cantități comparabile, ele metabolizează la început glucoza ignorând lactoza. După epuizarea cvasi-cantitativă a glucozei celulele încetează să

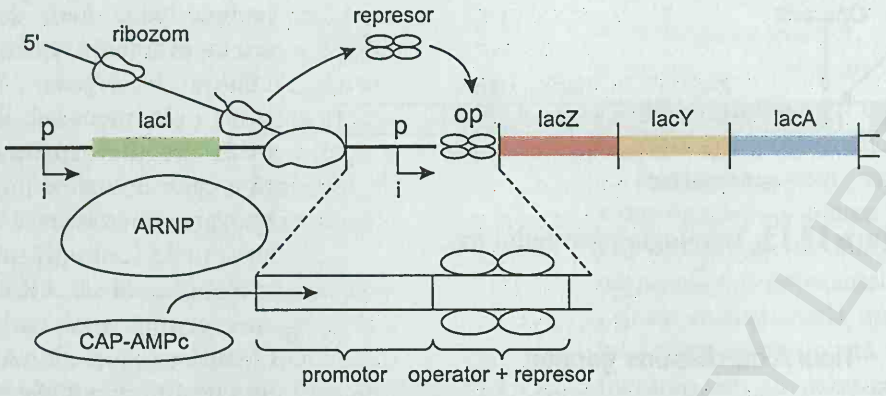


Figura 18.17. Operonul *lac* în stare inactivă (reprimat).

se mai dividă până ce operonul *lac* se activează pentru a intensifica de 1000 de ori sinteza β-galactozidazei care metabolizează lactoza producând glucoza necesară. Faptul că inducția β-galactozidazei nu se produce la începutul proliferării culturii bacteriene a fost pus la început pe seama **represiei enzimatice** determinată de un catabolit al glucozei. Fenomenului i s-a spus **represie prin catabolit**. Acum se știe că represia prin catabolit este de fapt mediată de o proteină (dimer) numită **CAP (catabolite activator protein)** asociată la AMPc [anim-lac].

Mecanismul la nivel molecular al inducției operonului *lac* este elucidat. Exprimarea genei *lacI* normale este constitutivă; această genă exprimă cu viteză constantă cele 4 subunități ale unei proteine (LacI) numită **represor lac**. În *Figura 18.17* este înfățișată cu o linie frântă și litera **i** prezența promotorului de la care este inițiată sinteza represorului lac. Tetramerul LacI are o mare afinitate ($K_d \approx 10^{-13}$ mol/l) pentru situs-ul de asociere al operatorului. Acest situs este o regiune a ADNdc cuprinzând 27 pb. În condiții bazale, tetramerul **represor** este asociat la **operator** (notat în figură cu **op**) la un locus constând dintr-o regiune compusă din 21 pb care în totalitate participă la recunoașterea și asocierea LacI. Această asociere este realizată în șanțul major al ADN fără afectarea împerecherii bazelor și a naturii dublu elicoidale. Operatorul este situat între **promotor** (notat în figură cu **p**) și gena *lacZ*, adică între situsul din promotor la care se asociază ARN polimeraza pentru a iniția transcrierea represorului și situs-ul de inițiere a transcrierii genei *lacZ* care codifică β-galactozidaza (fără săgeată în figură). Prin asociere la operator, molecula LacI împiedică transcrierea genelor structurale *lacZ, lacY* și *lacA* deoarece interferează cu asocierea ARN polimerazei (ARNP) la promotor. Altfel spus, moleculele de ARNP și LacI nu pot fi asociate în același timp la operonul *lac*. În acest fel, molecula represoare LacI este un **reglator negativ**: în prezența lui și în absența inductorului, descris mai jos, exprimarea genelor structurale este neglijabilă. În condiții bazale, într-o celulă bacteriană de *E. coli* există 20-40 molecule tetramerice de LacI, suficiente pentru ocuparea cvasi-totalității elementelor operator din celulă și blocarea transcrierii în absența semnalului inductor.

Un analog al lactozei, așa cum este **izopropil tiogalactozid** (IPTG), este capabil să inducă operonul *lac* fără a fi în același timp un substrat al β-galactozidazei este un exemplu **de inductor gratuit**.

Adăugarea lactozei sau a unui inductor gratuit (IPTG) la un mediu de creștere a *E. coli* bazat pe o sursă „alimetară" slab utilizată (de exemplu, acidul succinic) se soldează cu inducția rapidă a enzimelor codificate de operonul *lac*. Moleculele de lactoză sau IPTG pot pătrunde în celulele bacteriene chiar și în absența permeazei. Molecula de LacI are o mai mare afinitate pentru inductor decât pentru operator și, asocierea inductorului modifică conformația LacI [2P9H]. Această modificare reduce de 1000 de ori afinitatea represorului pentru operator ($K_d \approx 10^{-9}$ mol/l) ceea ce cauzează disocierea lui de locus-ul de asociere la operator. În aceste condiții ARNP se poate ataşa de catena codificatoare a situs-ului din promotor prin care este inițiată transcrierea deși, așa cum se arată mai jos, acesta este un proces cu eficiență scăzută. Oricum, aceasta este o cale prin care un inductor de-reprimă operonul *lac* și permite transcrierea genelor structurale ale **β-galactozidazei, galactozid permeazei** și **tiogalactozid transacetilazei** (*Figura 18.18*).

Traducerea ARNm policistronic poate începe înainte ca transcrierea să fie completă. De-represia operonului *lac* permite celulelor să sintetizeze enzimele necesare catabolizării lactozei ca

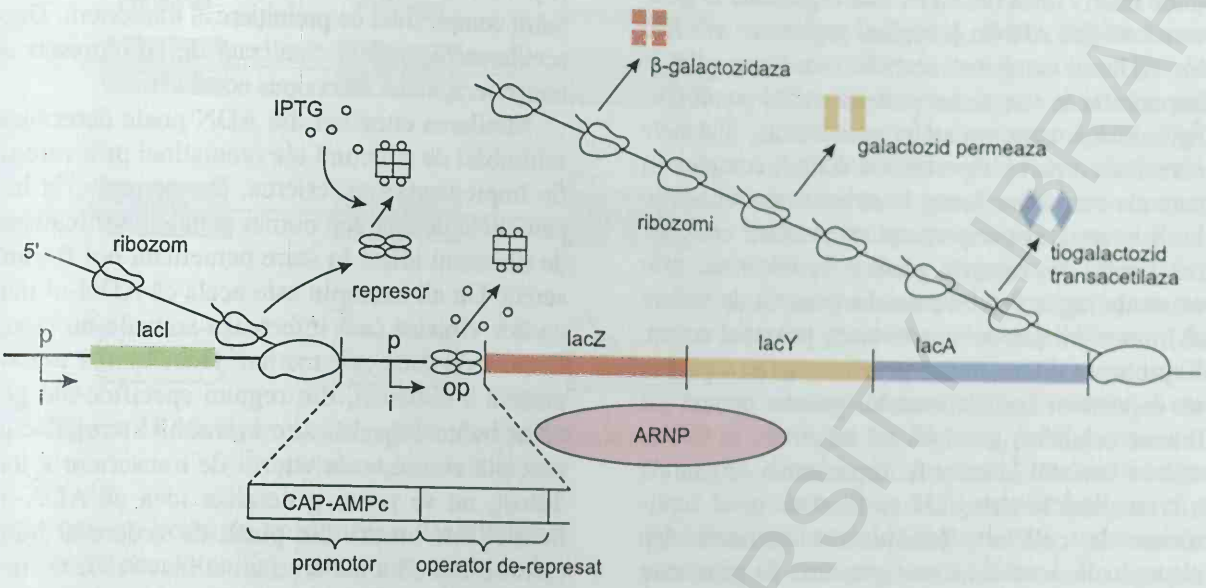


Figura 18.18. Operonul *lac* activat.

sursă „alimentară" (de atomi de carbon şi energie). Exprimarea indusă de IPTG a unor plasmide transfectate, înzestrate cu unitate reglatoare promotor-operator *lac* legată de unele gene, prin tehnici de inginerie genetică (tehnologia ADN-ului recombinat), este utilizată pentru obţinerea unor proteine de mamifere în *E. coli*.

Pentru ca ARNP să formeze un complex de preiniţiere (CPI) efficient este necesară prezenţa dimerului CAP la care să se asocieze AMPc. În celulele bacteriene, AMPc este un **semnal de înfometare**. Nucleotidul se acumulează în celule atunci când nu există o sursă de atomi de carbon, aşa cum este glucoza, care inhibă **adenilat ciclaza**, enzimă care catalizează conversia: ATP → AMPc + PP_i. Cu alte cuvinte, în prezenţa glucozei lipseşte proteina CAP saturată cu AMPc (complexul CAP-AMPc), iar ARNP nu poate iniţia transcrierea la viteză maximă a genelor structurale din operonul *lac*. În schimb, prezenţa complexului CAP-AMPc, care se asociază în amonte de situs-ul de legare la promotor a ARNP, determină pornirea transcrierii la viteză maximă. Studiile au arătat că o regiune a CAP contactează subunitatea α a ARNP facilitând asocierea enzimei de promotor. În acest fel, complexul CAP-AMPc acţionează ca **reglator pozitiv** deoarece prezenţa lui este necesară pentru exprimarea optimă a genelor. În concluzie, există factori de control şi condiţii necesare (şi suficiente) pentru atingerea vitezei maxime de transcriere a genelor operonului *lac*.

Operonul este controlat de către 2 factori *trans* distincţi care se asociază cu ADN:

- complexul CAP-AMPc care acţionează pozitiv pentru a facilita ataşarea productivă a ARNP de promotor,
- represorul LacI care acţionează negativ pentru a antagoniza ataşarea ARNP de promotor.

Activitatea maximă a operonului *lac* este atinsă atunci când:

- lactoza este prezentă la un nivel destul de ridicat pentru a împiedica ataşarea proteinei represoare LacI de operator. Aceasta este o condiţie necesară dar nu şi suficientă.
- nivelul glucozei este destul de scăzut în celulele bacteriene pentru ca nivelul AMPc să fie suficient de ridicat pentru a activa CAP.

Atunci când gena *lacI* a fost alterată de o mutaţie astfel încât produsul ei, o proteină LacI mutantă, să nu fie capabilă să se ataşeze de operator, organismul va exprima constitutiv (nu inductibil) operonul *lac*. Din contră, dacă mutaţia genei *lacI* conduce la o proteină mutantă LacI care „refuză" ataşarea inductorului, operonul *lac* rămâne reprimat chiar şi în prezenţa moleculelor inductoare.

18.3.2. Caracteristici ale reglării transcrierii la eucariote

Cea mai mare parte a ADN din celulele procariote este cuprinsă în gene, catenele matriţă având potenţialul de a fi transcrise atunci când sunt activaţi factorii *trans* pozitivi sau negativi. Situaţia este diferită în cazul celulelor mamiferelor în care o frac-

ţiune relativ mică din ADN este organizată în gene care codifică ARNm şi regiuni reglatoare asociate lor. ADN-ul celulelor eucariote este foarte pliat şi împachetat în complexul proteine-ADN numit cromatină. Aşa cum s-a arătat mai înainte, histonele constituie o parte importantă a acestui complex în care ele stau împachetate în structuri nucleozomale. S-a menţionat importanţa remodelării cromatinei pentru exprimarea genelor la eucariote prin existenţa regiunilor inactive din punctul de vedere al transcrierii şi a celor active sau potenţial active. Exprimarea diferenţiată a genelor care se suprapune exprimării complementului genetic comun (al tuturor celulelor) joacă un rol important în diferenţierea tisulară. În acest fel organizarea structurală a cromatinei se detaşează ca fiind un nivel suplimentar la care este controlată transcrierea. Un exemplu în acest sens este gruparea de gene care codifică β-globina. Această grupare este parte a cromatinei active în reticulocite, dar în miocite ea este parte a cromatinei inactive. În acest context modificarea covalentă a histonelor joacă un rol important în reglarea activităţii genelor.

La subcapitolul *Organizarea structurală a ADN* au fost enumerate principalele modificări covalente ale histonelor şi câteva din funcţiile acestora. Aceste modificări fac parte din prelucrarea post-traducere a histonelor, ele fiind dinamice şi reversibile. Acetilarea şi dezacetilarea sunt între cele mai bine înţelese transformări chimice ale histonelor. Descoperirea că acetilaza histonelor (HAT) este asociată cu co-reglatori implicaţi în reglarea transcrierii genelor (aşa cum s-a arătat la subcapitolul „Transcrierea ADN") a deschis calea creării unui nou concept în reglarea exprimării genelor. Se ştie că reacţia de acetilare o suferă radicalii de lizină situaţi în partea N-terminală a moleculelor histonice. Această modificare reduce sarcina pozitivă a acestor părţi ale catenelor histonice micşorând astfel afinitatea de asociere prin forţe electrostatice ale histonelor la situs-urile încărcate negative ale şanţului major al ADN. Alte modificări covalente ale histonelor pot să creeze noi situs-uri de asociere pentru proteine cum sunt complexele de remodelare ATP-dependentă a cromatinei. Aşa cum s-a arătat la capitolul „Transcrierea" aceste complexe pot să mărească accesibilitatea unor secvenţe de ADN prin îndepărtarea histonelor nucleozomale, adică prin evacuarea nucleozomilor. Acţiunea conjugată a co-reglatorilor (factori de remodelare şi modificare a cromatinei) poate „deschide" promotori ai genelor şi regiuni reglatoare pentru a facilita asocierea ARN polimerazei II şi a factorilor generali de transcriere necesari formării complexului de preiniţiere al transcrierii. Dezacetilarea histonelor, catalizată de co-represori ai transcrierii, au un efect opus acetilării.

Metilarea citozinei din ADN poate determina schimbări de structură ale cromatinei prin care să fie împiedicată transcrierea. De exemplu, în hepatocitele de şoarece numai genele codificatoare de ribozomi aflate în stare nemetilată pot fi transcrise. Un alt exemplu este acela că ADN-ul mai multor virusuri care infectează animale nu poate fi transcris dacă este metilat. Demetilarea intempestivă a citozinei, din regiuni specifice ale genelor inductibile de către hormonii steroizi, este asociată cu creşterea vitezei de transcriere a lor. Totuşi, nu se poate generaliza idea că ADN-ul metilat este inactiv din punct de vedere al transcrierii, sau că toată cromatina inactivă este metilată, nici că ADN-ul activ din punct de vedere al transcrierii este nemetilat.

La eucariote, ADN-ul care este într-o regiune activă din punct de vedere al transcrierii poate fi transcris şi, ca şi la procariote, un promotor dictează locul în care ARN polimeraza va iniţia transcrierea. Aşa cum s-a arătat la subcapitolul „Transcrierea ADN", promotorul din celulele mamiferelor acţionează printr-un mecanism mai complicat decât la procariote datorită participării unor factori *trans*, care la celulele procariote nu intervin deoarece acestea au un singur cromozom. Altfel spus, noţiunea de factor *trans* este neaplicabilă la procariote. Complexitatea reglării exprimării genelor la eucariote (faţă de procariote) este crescută de existenţa în plus a unor elemente (segmente de ADN) sau factori (proteine) care induc sau reprimă transcrierea, diferenţiază transcrierea în funcţie de ţesut, modulează acţiunile mai multor molecule efectoare. Recent s-a sugerat că activarea sau represia genelor poate să apară atunci când anumite gene intră sau ies din diferite compartimente sau locaţii sub-nucleare aşa cum s-a arătat în secţiunea „Prelucrarea ARN ribosomal şi ARN de transfer".

18.3.2.1. Reglarea promotorilor de transcriere în celulele eucariote

Referindu-ne acum la acele elemente inductoare ale celulelor eucariote definite în subcapitolul „Transcrierea ADN" cu numele **inductori** sau **amplificatori (enhancers)** este de adăugat că ele conţin de obicei mai multe situs-uri de asociere pentru o clasă de proteine, numite acolo **trans-activatori**, care facilitează formarea CPI

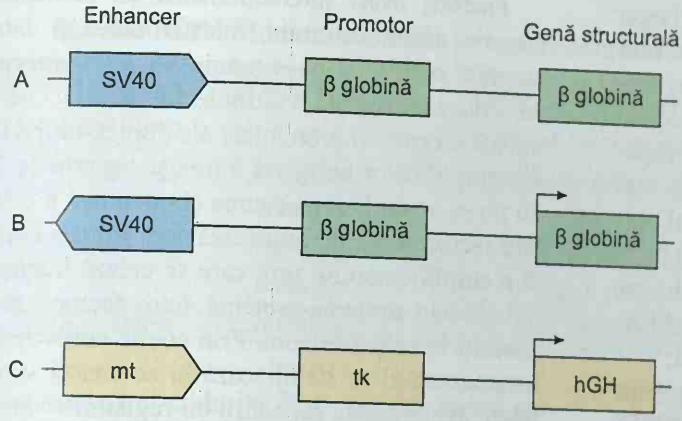


Figura 18.19. Exemple de reglare a inițierii transcrierii în celule eucariote.

prin care se pornește transcrierea. Amplificatorii diferă de promotor din câteva puncte de vedere precizate acolo, așa cum sunt marea distanță amplificator-promotor, că pot acționa în ambele sensuri 5' → 3' și 3' → 5' (proprietate înfățișată în *Figura 18.19* la variantele A și B), că pot acționa atât în amonte de capătul 5' cât și în aval de capătul 3' al promotorului. În plus față de aceste caracteristici este de menționat că amplificatorul este „**promiscuu**" – el poate acționa asupra mai multor promotori. Amplificatorul virusului simian vacuolant 40 (SV40) poate intensifica de 200 de ori transcrierea genei care codifică β-globina în celule care conțin atât amplificator SV40 cât și gena β-globinei în aceiași plasmidă (variantele A și B). Această combinație a fost construită folosind tehnologia ADN recombinat. Amplificatorul separat nu poate genera un produs care să acționeze asupra promotorului deoarece el este activ numai când se găsește în aceiași moleculă de ADN cu promotorul (adică este un element *cis*). Responsabile de efectul descris aici sunt anumite proteine care se atașează de amplificator.

Pe de altă parte, s-a demonstrat că unii factori *trans* (care provin de la alți cromozomi) ce se atașează de amplificator interacționează cu o mulțime de alte proteine implicate în controlul transcrierii. Este vorba de co-activatori de modificare a cromatinei, factorul co-reglator numit Mediator precum și unele componente ale mașinăriei de transcriere construite în jurul ARN polimerazei II bazale. Alte evenimente de interacțiune care implică factori *trans* și amplificatori se pot solda cu intensificarea atașării mașinăriei de transcriere bazale de promotor.

Un alt exemplu este cel al elementului reglator *mt* al exprimării metalotioneinei, proteină cu masă moleculară mică, foarte bogată în cisteină (30%), la care se asociază fiziologic ionii de zinc, cupru și seleniu precum și xenobiotice ca ionii Cd^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}. Ionii de cadmiu sau zinc induc transcrierea genei metalotioneinei și deci sinteza proteinei cu acest nume. Elementul de răspuns *mt* (sensibil la ionii menționați) mărește, prin intermediul promotorului timidin kinazei (*tk*), transcrierea genei hormonului de creștere uman (hGH). Fenomenul este înfățișat în *Figura 18.19*, varianta C. Combinații genetice, obținute folosind tehnologia ADN recombinat, au fost introduse în nucleul embrionului monocelular masculin de șoarece și apoi embrionul a fost plasat în uterul unei mame „surogat" pentru a dezvolta **animalul transgenic**. Prin includerea în dieta progeniturii a unor cantități suplimentare de Zn^{2+} aceasta a produs cantități crescute de hormon de creștere hepatic (somatomedină), ceea ce a determinat dezvoltarea somatică a ei.

Un sistem amplificator mult studiat este cel al **interferonului β**. Gena pentru acest tip de interferon este indusă de infecția virală a celulelor mamiferelor. După ce a fost infectată viral, celula are tendința să dezvolte un răspuns antiviral prin care dacă celula infectată nu poate fi salvată, să poată fi protejat întregul organism de infecția virală. Producerea de interferon este un mecanism prin care se poate realiza această protecție. Interferonul secretat de celula infectată interacționează cu celulele vecine pentru a inhiba replicarea virusului prin mai multe mecanisme și, deci, pentru a limita extinderea infecției virale. Amplificatorul care controlează inducția genei interferonului β este compus din 5 elemente *cis* grupate, numite PRD (**positive regulatory domains**) I-IV și NRD-I (**negative regulatory domain I**). Cu aceste elemente sunt asociați următorii factori *trans* specifici:

- factorul heterodimeric *trans*-activator **NF-kB** (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), compus din 2 proteine asociate (p50 și p65), asociat cu elementul *cis* PRD-II al amplificatorului [1LE5],
- **IRF3** și **IRF7**, membrii ai familiei IRF (**interferon regulatory factors**), asociați la elementul *cis* PRD-III (2O6G] relevă structura cristalină a complexului format de amplificatorul genei interferonului β cu IRF3),

- factorul heterodimeric zipper (fermoar) bogat în leucină **ATF-2/c-Jun**. ATF-2 şi c-Jun sunt membre ale unei largi familii de proteine bazice notată prescurtat **bZIP** în care leucina apare în heptade cu structură de „ansă buclată" repetitivă. Acest heterodimer se ataşează de secvenţa 5'-TGACATAG-3' din elementul *cis* PRD-IV al amplificatorului interferonului β,
- **HMG-I (Y)**, proteină architecturală care se ataşează de 4 situs-uri *cis* bogate în perechi A-T împrăştiate de-a lungul amplificatorului.

HMG-I (Y) face parte dintr-un grup de proteine cu înaltă mobilitate (high-mobility-group = HMG) caracterizate prin natura bazică prin care se ataşează la motivul „cotului" A-T din şanţul minor al ADN. Pe lângă rolul reglator pe care îl are în transcrierea interferonului β, HMG-I (Y) este implicată în reglarea genelor codificatoare ale:

- selectinei E,
- catenei α a receptorului interleukinei 2 şi interleukinei 4,
- receptorului CD44 din miocite,
- rodopsinei.

Paleta infecţiilor virale în care HMG-I (Y) este implicată în reglarea exprimării genelor virale include:

- virusul imunodeficienţei umane,
- virusul *herpes simplex* de tipul 1,
- JC poliomavirusul (papovavirusul) uman,
- papilomavirusul uman de tipul 18.

Situs-urile de care se ataşează HMG-I (Y) joacă un rol important în crearea structurii tridimensionale a complexului format de amplificatorul interferonului β cu factorii *trans* menţionaţi mai sus, complex căruia îi atribuim neologismul **„enhanceozom"** al interferonului β. Sufixul acestei denumiri sugerează asemănarea enhanceozom-ului cu nucleozomul din punctul de vedere al existenţei împachetării unor ansambluri proteice cu duplex ADN. Asocierea moleculelor HMG-I (Y) la duplex-ul ADN induce formarea structurii stereospecifice a enhanceozom-ului în care toţi cei 4 factori sunt activaţi atunci când semnalele atacului infecţios viral sunt sesizate de celulă. De îndată ce s-a format, enhanceozom-ul induce o importantă intensificare a transcrierii genei interferonului β ca o consecinţă a infecţiei virale. Prin formarea acestui complex se crează condiţiile necesare formării CPI pe promotorul *cis* al genei interferonului β şi, deci, activarea transcrierii acestei gene.

Factorii *trans* interacţionează cu elementele *cis* ale amplificatorului interferonului β într-o anumită **ordine** şi de o manieră înalt-**cooperativă**. Ataşarea iniţială a 4 molecule de HMG-I(Y) induce încovoieri pronunţate ale duplex-ului ADN din amplificator obligând întreaga regiune de 70-80 pb să se curbeze. Legarea cooperativă a celorlalţi factori *trans* definitivează conformaţia curbată a amplificatorului prin care se crează interacţiuni directe proteină-proteină între factorii *trans* asociaţi la enhanceozom. Prin aceste contacte enhanceozom-ul se stabilizează şi se crează suprafeţele 3D necesare recrutării co-reglatorilor modificatori de cromatină cu activitate enzimatică (Swi/Snf: ATP-aza, P/CAF: acetiltransferaza histonelor) menţionaţi şi în subcapitolul „Transcrierea ADN". În plus, se crează condiţiile recrutării maşinăriei de transcriere generală (ARN polimeraza II + GTFs). Deşi cele 5 elemente *cis* (PRD I-IV şi NRD I) pot stimula modest (de ~10 ori) în mod independent transcrierea unei **gene-reporter** din celulele transfectate, toate cele 5 elemente *cis*, prin activare cu factori *trans* într-o ordine adecvată, sunt necesare pentru edificarea unui enhanceozom cu arhitectura capabilă de stimularea eficientă (de ~100 de ori) a transcrierii genei codificatoare a ARNm. Genele-reporter, cum sunt cele care codifică **cloramfenicol acetiltransferaza** (CAT) bacteriană şi **luciferaza**, sunt utilizate în scopul definirii amplifictorilor şi a altor elemente reglatoare din celulele eucariote. Pe de altă parte, prin legarea unui amplificator cunoscut de o genă-reporter şi introducerea acestui **amplificator-reporter** himeric într-un embrion monocelular se poate crea un animal transgenic pe care se pot testa proprietăţile amplificatorului încorporat, cum ar fi tipul de stimulare a exprimării genelor. Rezultatele experimentelor pe animale transgenice au relevat faptul că exprimarea genică tisular-specifică este rezultatul acţiunii amplificatorilor (inductorilor) şi represorilor.

18.3.2.2. Motive structurale pe care le conţin proteinele reglatoare ale transcrierii

În afara particularităţii de „ansă buclată" a proteinelor din familia bZip numită curent **leucine zipper** mai există două motive structurale: **helix-turn-helix** şi **zinc finger**. Toate aceste 3 motive sunt recunoscute în interacţiunile proteină-ADN implicate în reglarea exprimării genelor la nivelul transcrierii. Exemple de proteine care conţin aceste motive apar în *Tabelul 18.IV* în care, pe lângă proteinele motivate structural, sunt precizate orga-

Tabelul 18.IV. Motive structurale pe care le conţin unele proteine reglatoare ale transcrierii

Motiv structural	Organism	Proteina reglatoare	Cod PDB	Tehnica
Helix-turn-helix	E. coli	Represorul *lac* tetrameric	2R2V	Difracţie raze X
Zinc finger	Sacch.cer.	Factorul de transcriere SWI5	1NCS	RMN
	Xenopus	Xfin	1ZNF	RMN
	Xenopus	TFIIIA	1UN6	Difracţie raze X
	mamifer	Sp1	1VA1	RMN
Leucine zipper	mamifer	c-Jun	2H7H	Difracţie raze X

nismele-sursă şi codurile PDB ale sistemelor rezolvate cristalografic care conţin proteinele sau părţi ale acestor proteine.

Din compararea legării de ADN a proteinelor care conţin aceste motive structurale se desprind câteva observaţii.

- Ataşarea se face cu mare afinitate la situs-urile specifice din structura ADN în timp ce la alte regiuni (nespecifice) ea se face cu mai mică afinitate.
- Contactele pe care factorii de transcriere proteici le fac cu ADN implică mici regiuni ale proteinelor restul participă la dimerizarea monomerilor sau furnizează suprafeţe de contact pentru co-activatori sau co-represori sau oferă situs-uri de ataşare a liganzilor.
- Interacţiunile proteină-ADN sunt de tip necovalent (legături de hidrogen, punţi saline şi interacţiuni van der Waals).
- Prezenţa motivelor în structura unei proteine este un indiciu că aceste proteine se ataşează de ADN.
- Proteinele cu motivele helix-turn-helix sau leucine zipper formează dimeri şi situs-urile de asociere ale ADN sunt palindroame simetrice.
- Aceste caracteristici permit interacţiuni cooperative şi amplifică afinitatea de asociere.

18.3.2.3. Contribuţia miARN la reglarea exprimării genelor

Recent descoperita clasă a microARN din celulele eucariote joacă un rol important în reglarea exprimării genelor. Aceste molecule formate din cca. 22 de ribonucleotide reglează „traductibilitatea" ARNm pe 3 căi:

- represia traducerii ARNm,
- inducţia degradării ARNm,
- stimularea traducerii ARNm (în mai puţine cazuri).

În unele cazuri modularea activităţii ARNm de către miARN are loc în **corpusculii P**. Aceştia sunt organite citoplasmatice care modulează metabolismul ARNm.

Câteva din activităţile corpusculilor P sunt următoarele:

- deprotejarea şi degradarea moleculelor de ARNm nedorite,
- stocarea moleculelor de ARNm până când acestea devin necesare traducerii,
- rol ajutător în corelaţie cu siARN în represia traducerii ARNm.

Acţiunea miARN se poate solda cu schimbări importante în producţia de proteine şi, deci, în exprimarea genelor. Aşa cum s-a arătat în subcapitolul „Prelucrarea transcriptelor primare", moleculele de miARN au fost implicate în numeroase boli umane cum sunt bolile de inimă, cancerul, diabetul, infecţia virală.

În mod asemănător asocierii factorilor proteici de transcriere la ADN, moleculele de miARN sunt *trans*-active: odată ce sunt sintetizate şi prelucrate adecvat (aşa cum se vede în *Figura 18.11*) ele interacţionează cu proteine specifice şi se asociază cu moleculele ţintă de ARNm. Această asociere este ghidată de împerecherea normală a bazelor azotate conformă principiului de complementaritate aplicat la structurile dublu catenare hibride. În general, dacă împerecherea **miARN-ARNm** conţine una sau mai multe nepotriviri, traducerea moleculei de ARNm este inhibată. Dacă împerecherea miARN-ARNm este perfectă pe toată lungimea de 22 de nucleotide ale miARN, segmentul complementar de ARNm este degradat. În concluzie, dacă împerecherea bazelor de pe lungimea segmentului dublu catenar hibrid este perfectă sau aproape perfectă are loc clivarea ARN.

18.3.2.4. Alte mecanisme de reglare a exprimării genelor

În afara utilizării promotorilor pentru controlul transcrierii în exprimarea genelor, celulele eucariote folosesc **prelucrarea alternativă a ARN**. Această cale poate fi urmată atunci când sunt folosite situs-uri de clivare intron-exon şi/sau situs-

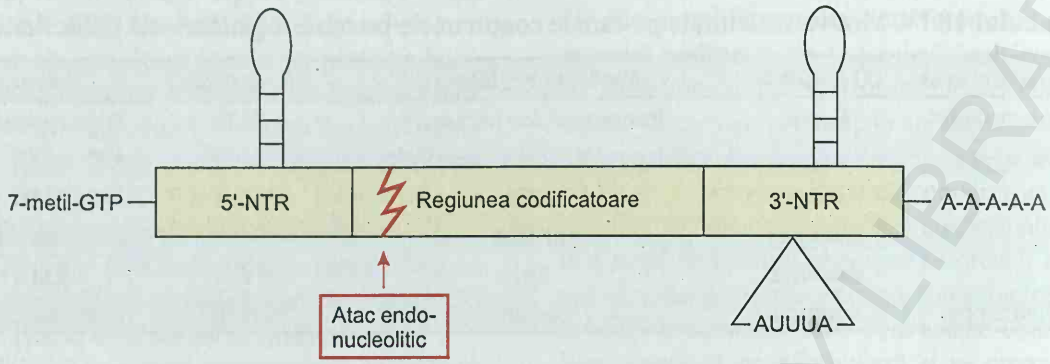


Figura 18.20. Rolul reglator al prelucrării ARNm din eucariote. Explicaţii în text.

uri de poliadenilare. Un alt mecanism de control constă în **reglarea stabilităţii ARNm**. Deşi aproape tot ARNm din celulele mamiferelor este relativ stabil (timpul de înjumătăţire este de ordinul orelor), unele molecule au timpi de înjumătăţire scurţi (10-30 minute). Schimbarea stabilităţii unei molecule de ARNm poate avea efecte importante asupra proceselor biologice. ARNm există în citoplasmă sub formă de particule de ribonucleoproteine (RNP). Unele din aceste proteine protejează ARNm de digestia la care îl pot supune nucleazele, în timp ce alte proteine, în anumite condiţii, favorizează atacul nucleazic. Moleculele de ARNm sunt stabilizate sau destabilizate prin ataşarea proteinelor de anumite secvenţe ale ARNm. În plus, unii efectori cum sunt hormonii pot să regleze stabilitatea ARNm prin creşterea sau descreşterea cantităţii acestor proteine.

Capetele moleculelor de ARNm sunt implicate în stabilizarea lor. Aşa cum s-a mai arătat anterior, capătul 5' al moleculei de ARNm din celulele eucariote (de obicei protejate cu 7-metil-GTP) previne atacul 5'-exonucleazelor în timp ce prelungirile de poliA interzic acţiunea 3'-exonucleazelor. La o moleculă de ARNm protejată la capete producerea unei singure clivări în interiorul catenei (endonucleolitic) ar permite exonucleazelor să digere întreaga moleculă. Existenţa unor secvenţe ne-traductibile la capătul 5' şi la capătul 3' (notate la subcapitolul „Procesarea transcriptelor primare" cu 5'-NTR şi 3'-NTR) favorizează sau previn atacul endonucleazic menţionat. Câteva evenimente în care sunt implicate regiunile ARNm eucariotic relevă potenţialul reglator al lor.

- deleţia regiunii 5'-NTR se soldează cu prelungirea de 3 până la 5 ori a timpului de înjumătăţire a ARNm C-myc, care serveşte ca matriţă pentru sinteza oncoproteinei c-MYC implicată în proliferarea rapidă a celulelor canceroase,
- scurtarea regiunii codificatoare a ARNm care codifică histonele determină creşterea timpului de înjumătăţire al acestora,
- poliA de la capătul 3' măreşte sau diminuează stabilitatea ARNm. Absenţa poliA este asociată cu degradarea rapidă a ARNm,
- ARN-ului mesager care codifică histonele îi lipseşte poliA, însă el dispune de o secvenţă situată aproape de capătul 3' care formează o buclă ce conferă rezistenţă la atacul exonucleazic asupra capătului 3'. Structura de buclă din regiunea 3'-NTR participă, prin intermediul ionului de fier, la reglarea exprimării genice a receptorului pentru transferină. O altă buclă care reglează stabilitatea ARNm se găseşte şi în regiunea 5'-NTR,
- În regiunea 3'-NTR există secvenţe bogate în perechi A-U care conţin secvenţa AUUUA. Ele apar în moleculele de ARNm eucariotic cu timp de înjumătăţire foarte scurt, cum sunt unele molecule de ARNm care sunt produşi de transcriere ai oncogenelor.

Aceste exemple sugerează câteva mecanisme prin care este reglată stabilitatea/ funcţia ARNm, dar şi sinteza ARNm. Reglarea acestor procese conferă celulelor o remarcabilă adaptabilitate.

Bibliografie selectată

1. Kim E. Barrett, Susan M. Barman, Scott Boitano, Heddwen Brooks, Auths, *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23 edition, 2010, McGraw-Hill Co. Inc. Section I: Cellular & Molecular Basis for Medical Physiology, Chapter 1: General Principles & Energy Production in Medical Physiology.
2. Charles F. Brunicardi, Dana K. Andersen, Timothy R. Billiar, David L. Dunn, John G. Hunter, Jeffrey B. Matthews, Raphael E. Pol-

lock, Auths, *Schwartz's Principles of Surgery*, 9 edition, 2010, McGraw-Hill Co. Inc. Part I. Basic Considerations, Chapter 15. Molecular and Genomic Surgery.
3. Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo, Eds, *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17 edition, 2008, McGraw-Hill Co. Inc. Part III: Genetics and Disease, Chapter 62: Principles of Human Genetics.
4. Jean-Louis Junien, Bart Staels, Eds, *Nuclear receptors as molecular targets for cardiometabolic and central nervous system diseases*, 2008, IOS Press. An Introduction to the Nuclear Receptor Superfamily, pp. 5-15.
5. Bertram G. Katzung, Ed; Susan B. Masters, Anthony J. Trevor, Assoc. Eds, *Basic & Clinical Pharmacology*, 11 edition, 2009, McGraw-Hill Co. Inc., Section VIII, Chapter 54: Cancer Chemotherapy
6. Robert K. Murray, David A Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil, Auths, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 28 edition, 2009, McGraw-Hill Co. Inc. Section IV. Structure, Function, & Replication of Informational Macromolecules.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 19.
Aspecte paraclinice şi metabolice în proliferările maligne

Minodora Dobreanu, Alina Mărginean

19.1 Introducere

Astăzi cancerul reprezintă a doua cauză de mortalitate în ţările industrializate (reprezentând 12% din totalul deceselor de pe glob), după patologia cardiovasculară. În fiecare an, peste şase milioane de persoane mor datorită patologiei tumorale şi se descoperă peste zece milioane de noi cazuri de cancer. În ciuda eforturilor ştiinţifice în sensul diagnosticului precoce şi terapiei curative, o treime din cazurile de cancer nu pot fi diagnosticate şi tratate în timp util. Prognosticul OMS pentru următorii 20 de ani este pesimist: peste 10 milioane de decese şi peste 15 milioane de cazuri noi anual. Momentul descoperirii unui neoplasm are un impact major asupra ratei de supravieţuire în cancer.

Celulele din structura organismelor animale şi vegetale se divid şi asigură creşterea şi dezvoltarea organismului ca întreg, precum şi repararea sau înlocuirea celulelor îmbolnăvite sau moarte. Diviziunea şi creşterea celulară sunt controlate prin intermediul ADN-ului din nucleu. Acest proces, se află în mod normal într-un echilibru desăvârşit, care dacă este modificat la nivelul uneia sau mai multor celule, proliferarea celulară degenerează şi apare cancerul. Masa de celule tumorale va afecta invariabil celelalte celule ale organismului, ţesuturile şi chiar organele din jurul lor sau în anumite cazuri, organe aflate la distanţă. În mod normal diviziunea unei celule sau a unui grup de celule se opreşte atunci când nevoile organismului au fost îndeplinite. Acest control este pierdut în cazul proliferărilor maligne deoarece substratul genetic răspunzător de procesul creşterii şi diferenţierii celulare este modificat. În prezent se ştie că toţi factorii răspunzători de apariţia cancerului, alterează direct sau indirect, genele implicate în diviziunea celulară.

În organismele sănătoase celulele proliferează într-o manieră controlată. Acest control este exercitat prin intermediul unor gene care, în funcţie de nevoile organismului, comandă diviziunea celulară, diferenţierea, creşterea sau apoptoza celulară. Acest echilibru dinamic între stimularea şi supresia proliferării celulare este guvernat de două tipuri de gene:

- Promotoare, care se numesc şi *proto-oncogene*. Acestea răspund la semnalele de creştere şi acţionează ca reglatori pozitivi ai proliferării celulare *în prezenţa unor factori de creştere* (sau semnale de creştere) eliberate în funcţie de nevoile organismului.
- Supresoare (*tumour supressors*), care acţionează ca inhibitori ai proliferării. Mutaţiile acestora au ca rezultat proliferarea celulară necontrolată. Uneori supresia este de fapt consecinţa absenţei elementului activator.

În cazul proliferărilor maligne genele promotoare au suferit diverse mutaţii (devin ONCOGENE - gene cauzatoare de cancer/gene proliferatoare mutante) şi stimulează proliferarea celulară chiar şi în lipsa semnalelor de creştere (*Figura 19.1).*

Ciclul celular este procesul complex prin care o celulă îşi dublează conţinutul şi se divide *(Figura 19.2).* Acesta constă din patru faze: G1 (creştere şi metabolism normal), S (replicarea ADN), G2 (creştere şi pregătire pentru mitoză) şi faza M (mitoza). La acestea se adaugă faza G0 care este considerată o stare temporară de repaus în care celula a părăsit ciclul şi nu se mai divide (*vezi şi 17.2.6.*).

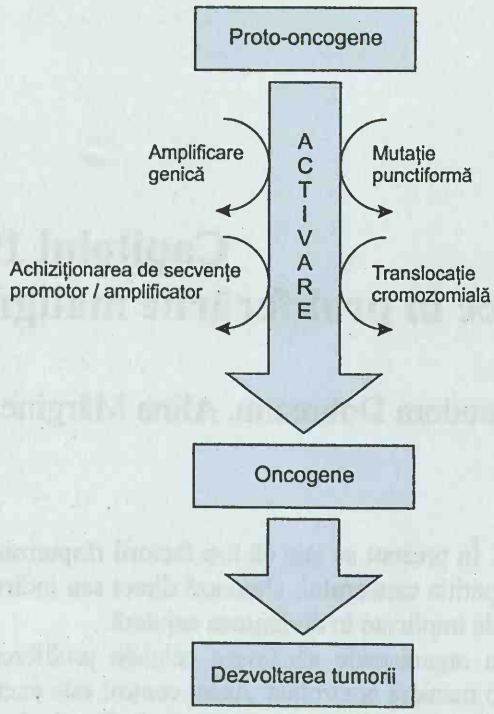


Figura 19.1. Mecanisme genetice implicate în apariţia tumorilor

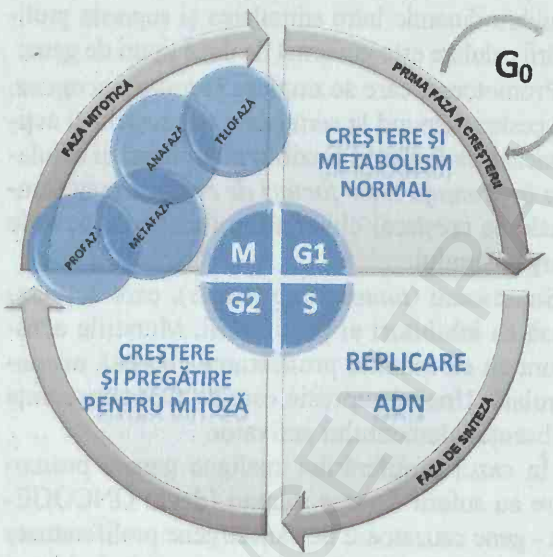


Figura 19.2. Etapele ciclului celular

Factorii de creştere au rolul de a accelera creşterea şi diviziunea celulară. Aceştia se comportă ca şi molecule semnal şi de obicei sunt citokine sau hormoni polipeptidici (peste 50 cunoscuţi în prezent). Răspunsul celular la fixarea factorilor de creştere pe receptorii membranari constă în:

- Creşterea concentraţiei calciului intracelular (*vezi şi 14.3.2.*);
- Reorganizarea fibrelor de actină;
- Activarea factorilor de transcripţie sau translocarea acestora în nucleu;
- Sinteza ADN şi diviziunea celulară;

Receptorii membranari ai factorilor de creştere sunt proteine transmembranare cu domenii citoplasmatice tirozin-kinazice (*vezi şi 14.3.3.4*).

Unul dintre cei mai importanţi factori de creştere care acţionează prin intermediul sistemului tirozin-kinazei este *factorul de creştere derivat din trombocite* (platelet-derived growth factor - PDGF). Acesta reglează creşterea şi diviziunea celulară şi are un rol important în angiogeneză. Efectele sale se manifestă prin intermediul unui receptor tirozin-kinazic (PDGFR). După legarea PDGF, acest receptor dimerizează şi se activează printr-un proces de autofosforilare. Acest proces are rolul de a media legarea unor cofactori şi de a activa unele căi de conducere cum ar fi calea PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaza) cu un rol important în migrarea celulară.

Apoptoza este moartea celulară programată. O serie de evenimente biochimice duc la apariţia unor modificări celulare caracteristice cum ar fi: micşorarea celulei, condensarea cromatinei, fragmentarea ADN-ului şi a nucleului, modificari care au ca şi consecinţă moartea celulei. Un rol important în apoptoză îl au *caspazele* (proteaze cisteinice care degradează organitele celulare) şi Bcl-2 (genă care codifică sinteza unor proteine care reglează permeabilitatea membranei mitocondriale externe şi exercită un efect anti-apoptotic).

Reglarea ciclului celular se realizează prin intermediul: ciclinelor (*vezi şi 17.2.7*), factorilor de creştere mitogenici şi a proteinei p53.

P53 este o proteină supresoare tumorală, prin care celula monitorizează apariţia unor leziuni ale ADN-lui pe parcursul ciclului celular. Această proteină poate frâna ciclul celular (în fazele G1-S) pentru a permite repararea leziunilor minore ale ADN-ului, prin inducerea sintezei unor inhibitori ai CDKs (Cyclin – dependent kinases): p15, p16, p21, p27. Dacă leziunile ADN sunt majore/ ireparabile cu potenţial mutagen, p53 declanşează apoptoza celulei.

30% dintre celulele tumorale au o genă mutantă activă a unui element semnalizator *Ras*, care acţionează ca un întrerupător molecular în transducţia unor elemente cheie pentru creşterea şi diferenţierea celulară. *Ras* este o GTP-ază, care evoluează între două forme: Ras-GTP (activă) şi Ras – GDP (inactivă). Una dintre cele mai importante funcţii ale *Ras* este aceea de a regla

cascada MAPK (Mitogen - Activated Protein Kinase), implicată în fosforilarea unor factori de transcriere nucleari importanţi în sinteza ADN şi diviziunea celulară.

În cazul mutantelor Ras, activarea se poate produce în lipsa semnalelor extracelulare, ceea ce poate constitui elementul iniţiator al unui proces malign.

Protein-kinaza mitogen-activată (mitogen–activated protein kinase - MAPK) este o protein-kinază serin/treonin-specifică capabilă să raspundă la o serie de stimuli extracelulari (factori mitogeni, stres osmotic, şoc termic şi citokine proinflamatoare) şi să regleze expresia genică, mitoza, diferenţierea celulară, proliferarea sau apoptoza. Medicamente care induc fenomenul de down-regulation pe MAPK ar putea fi folosite pentru tratamentul afecţiunilor maligne.

Kinaza Janus (JAK) este o tirozin-kinază intracelulară cu rol în transmiterea semnalelor mediate de citokine. După legarea citokinelor la receptorii lor, JAK se activează şi fosforilează aceşti receptori făcând posibilă acţiunea unor molecule semnal din familia de traducători ai semnalelor şi activatori ai transcripţiei (STAT – *signal transducer and activator of transcription*).

Cancerul apare atunci când se modifică starea de echilibru dintre acţiunea oncogenelor şi cea a genelor supresoare tumorale. Printre cele mai frecvent întâlnite în cadrul afecţiunilor maligne se găsesc oncogenele Myc şi Ras. Gena Myc codifică un factor de transcripţie răspunzător de reglarea expresiei a 15% din genotip. O variantă mutantă a Myc se găseşte în numeroase tipuri de cancer şi duce la exprimarea necontrolată a multor gene implicate în proliferarea celulară. Genele supresoare tumorale şi proteinele codificate de acestea au un efect inhibitor asupra ciclului celular sau induc apoptoza după următorul algoritm: a) represia genică; b) decuplarea ciclului celular în cazul leziunilor ADN-ului; c) dacă leziunile ADN nu pot fi remediate se iniţiază apoptoza; d) împiedicarea metastazării celulelor tumorale prin acţiunea proteinelor de adeziune celulară.

19.2 Transformări metabolice în celulele maligne

Este unanim acceptat faptul că cercetările conduse de *Otto Warburg* şi publicate în 1926 au stabilit noi direcţii în studiul metabolismului celulelor tumorale. Un interes crescut pentru necesităţile energetice şi metabolismul intermediar al celulelor neoplazice se observă şi astăzi,când comunitatea ştiinţifică are la dispoziţie metode noi şi mult mai evoluate de analiză.

Pentru a înţelege transformările metabolice ale celulelor tumorale trebuie să punctăm următoarele:

- Celulele tumorale derivă din celule normale care au suferit modificări genetice, rezultând un fenotip neoplazic dotat cu potenţial malign;
- Pentru a-şi manifesta malignitatea celulele neoplazice vor avea metabolismul modificat în concordanţă cu necesităţile bioenergetice şi de sinteză;
- Celulele maligne au un comportament de tip *parazitar*: acestea au numai funcţiile necesare propagării celulare, care se desfăşoară în detrimentul gazdei;

S-a observat că mediul în care se produce proliferarea celulară necontrolată influenţează metabolismul celular. Un rol important îl are cantitatea de oxigen şi de micronutrienţi livrate de circulaţia sanguină. Astfel în cadrul unei mase tumorale se vor întâlni invariabil populaţii de celule ce au la dispoziţie o cantitate progresiv mai mică de oxigen, de la normoxie până la hipoxie şi chiar anoxie. De aceea, metabolismul celulelor se modifică continuu în concordanţă cu accesul lor la oxigen. Cu cât mediul devine mai hipoxic proliferarea va fi compromisă, deoarece majoritatea celulelor maligne au un metabolism aerob. De asemenea, pentru a putea elimina produşii de catabolism celulele neoplazice trebuie să aibă acces la circulaţia sanguină. Totuşi celulele maligne pot induce fenomenul de *up-regulation* pentru anumiţi factori sintetizaţi de organism în condiţii de hipoxie, stimulând angiogeneza şi asigurându-şi astfel condiţiile necesare pentru proliferare. De multe ori, pentru a-şi continua existenţa parazitară, unele celule părăsesc locul unde s-au dezvoltat iniţial, în căutarea unui alt mediu propice pentru desfăşurarea activităţii tumorale (fenomen numit *metastazare*).

Trecerea de la metabolismul *funcţional* al celulei normale spre un metabolism bazat pe lipogeneză/ colesterogeneză *de novo* este una din cele mai importante modificări constatate la celulele neoplazice. Necesitatea lipogenezei /colesterogenezei *de novo* este comună tuturor celulelor maligne; aceşti compuşi sunt folosiţi în procesul de membranogeneză, etapă necesară în proliferarea celulară. Lipogeneza depinde de cantitatea de acetilCoA (acetil coenzima A) prezentă în citosol. Aceasta reprezintă materia primă pentru scheletul de carbon al acizilor graşi şi lanosterolului (intermediar în colesterologeneză). La mamifere sursa majoră de AcetilCoA citosolică provine din producţia mitocondrială de

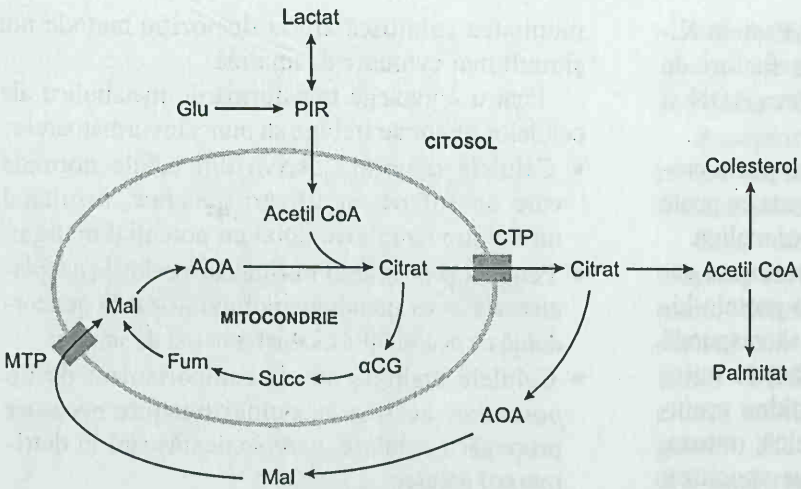


Figura 19.3. Orientarea metabolismului celular tumoral spre sinteza de lipide

citrat care este transportat în citosol prin intermediul unei proteine transportoare (*citrate transporter protein* - CTP) (*Figura 19.3*). În mod normal expresia genei care controlează sinteza acestui transportor este scăzută deoarece citratul este reţinut în mitocondrie şi oxidat în cadrul *ciclului Krebs* pentru a obţine energie şi metaboliţi intermediari necesari altor căi metabolice. Celulele maligne induc *up-regulation* pentru CTP ceea ce permite transportul citratului în citosol, unde este apoi transformat în Acetil CoA şi oxalacetat sub acţiunea citrat-liazei ATP-dependente. În acelaşi timp o parte a citratului este oxidat pe calea ciclului Krebs.

19.3 Diagnosticul precoce al proliferărilor maligne

În vederea diagnosticării timpurii a proliferărilor maligne au fost propuse o serie de teste şi investigaţii paraclinice. Astfel de exemple sunt: mamografia pentru detectarea cancerului de sân, testele pentru sângerări oculte şi colonoscopia pentru cancerul colorectal, tuşeul rectal şi PSA pentru cancerul de prostată sau frotiul Papanicolaou pentru diagnosticul precoce al cancerului de col uterin.

O serie de teste efectuate din serul pacienţilor sau din alte produse biologice, se bazează pe proprietatea ţesutului tumoral de a produce diverse substanţe care ajung în circulaţia sanguină sistemică. Aceste substanţe poartă numele de *markeri tumorali* (sau *biomarkeri*). Nu întotdeauna însă, aceşti markeri sunt determinaţi în timp util.

Markerul tumoral este o substanţă produsă de către un ţesut tumoral, exprimată în/pe celula producătoare (markeri celulari) sau secretată în umorile înconjurătoare (markeri umorali/solubili în lichide biologice). O gamă largă de molecule pot fi clasificate ca markeri tumorali: enzime, hormoni, antigene oncofetale, carbohidraţi, antigene de grup sanguin, proteine, receptori, gene sau produşii unor gene. În 1847 a fost descoperit primul marker de acest fel prin precipitarea unei proteine în urina încălzită şi acidifiată şi care a primit numele de *proteină Bence-Jones*. Ulterior s-a arătat că aceasta reprezintă lanţul uşor monoclonal al imunoglobulinelor secretate de celulele tumorale plasmatice. În prezent proteinuria Bence-Jones este folosită pentru diagnosticul mielomului multiplu.

În 1960 a fost introdusă tehnica *radioimună,* iar după 1970 dezvoltarea acesteia a atras după sine o îmbunătăţire în determinarea biomarkerilor precum şi descoperirea unor noi molecule implicate în procesul carcinogenetic. Ulterior descoperirea anticorpilor monoclonali a dus la creşterea specificităţii şi sensibilităţii determinărilor. Un exemplu în acest sens este descoperirea cu ajutorul anticorpilor monoclonali a unor antigene de suprafaţă cum sunt CA125 şi CA15-3. Acestea fac parte din clasa carbohidraţilor şi au o sensibilitate semnificativ mai mare în comparaţie cu antigenele oncofetale (CEA – atigenul carcino embrionar). Mai recent, studii referitoare la oncogene şi gene supresoare tumorale, precum şi dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară (tehnica ADN-ului recombinant, reacţia de polimerizare în lanţ - PCR, secvenţierea proteică automată) au dus la înţelegerea markerilor tumorali la nivel molecular. Noile metode de genomică şi proteomică (desorbţie/ ionizare laser cu asistare matricea-lă – MALDI; cel mai adesea în combinaţie cu această tehnică este folosit spectrometrul de masă) vor schimba modul de măsurare şi vor ajuta la descoperirea unor noi markeri tumorali.

19.3.1 Utilizare clinică

Pentru ca markerii tumorali să fie de utilitate clinică, măsurarea în laborator a acestora trebuie să fie clar distinctă de posibilitatea de detectare la pacienţi care nu au tumora. Putem spune despre markerul tumoral că acesta trebuie să fie sensibil, cu alte cuvinte nivelele crescute trebuie să indice prezenţa tumorii. Markerul trebuie să fie şi specific, adică nu trebuie să găsim valori crescute dacă tumora nu este prezentă.

Screening-ul. Utilizarea markerilor tumorali în scop de screening este de mare importanţă medicală. Din păcate, foarte puţini markeri sunt suficient de sensibili pentru acest scop. Un astfel de exemplu ar putea fi dozarea calcitoninei în familiile cu sindroame neoplazice endocrine multiple de tip 1, secreţia calcitoninei fiind crescută în carcinoamele medulare tiroidiene. De asemenea, la pacienţii cu ciroze hepatice alcoolice având risc înalt de a dezvolta carcinom hepatocelular, detectarea unor nivele crescute de α-fetoproteină serică poate indica dezvoltarea unei tumori.

Diagnosticul cancerului. Un al doilea scop în care sunt utilizaţi markerii tumorali este acela de confirma un diagnostic de tumoră. La pacienţi cu semne sau simptome clinice, determinarea unui marker plasmatic sau urinar cu specificitate înaltă este frecvent utilizată pentru a confirma diagnosticul. Un astfel de caz este dozarea în urină a acidului 5-hidroxiindolacetic (5-HIAA) în sindroamele carcinoide sau a PSA în tumorile prostatei.

Stabilirea prognosticului bolii canceroase. În unele cazuri, concentraţia markerului specific este în strânsă relaţie cu masa ţesutului tumoral.

Monitorizarea răspunsului la tratament. Identificarea recurenţelor. Prezenţa unui marker tumoral oarecare, monitorizat în cinetică, după tratamentul chirurgical, chimioterapie sau radioterapie poate fi utilă pentru a determina răspunsul la tratament. Dacă markerul a avut iniţial o concentraţie crescută, valori intermitent crescute după terapia chirurgicală, chimioterapie sau radioterapie (aşa-numita remisie), pot fi utilizate pentru a identifica recăderea. Uneori însă tumorile pot să nu mai exprime markerul tumoral, în ciuda faptului că ele cresc în dimensiune şi metastazează.

19.3.2 Clasificarea markerilor tumorali după forma antigenelor tumorale

- TSA-Tissue Specific Ag - Antigene care aparţin doar celulelor tumorale
- TAA-Tissue Associated Ag - Antigene care aparţin şi celulelor normale

Deşi nu toate celule neoplazice dispun de markeri deosebiţi de cei fiziologici, la majoritatea pot fi identificate structuri antigenice diferite, numite neoantigene. Aceste structuri pot fi clasificate în următoarele 2 grupe:

1.Antigenele **retrogenetice**: în condiţii fiziologice ele sunt exprimate exclusiv pe suprafaţa celulelor embrionare, dar nu şi a celor de după naştere. Din această cauză se numesc şi antigene oncofetale. În această grupă intră: α-fetoproteina (AFP) şi antigenul carcinoembrionar (CEA), care pot reapare după naştere în caz de neoplazii hepatice primitive, intestinale sau pancreatice dar şi pulmonare.

2.Antigenele **de diferenţiere**: apar numai într-o fază determinată a maturaţiei sau diferenţierii unor serii celulare (ca în cazul elementelor imature din leucemii sau limfoame).

Antigene onco-fetale. Sunt exprimate fiziologic în viaţa intrauterină (între lunile 2-6 de sarcină, în intestinul, ficatul, pancreasul fătului), reapar la adult:

- CEA - exprimat atât pe celule cât şi în fluidul extracelular, în multe tumori ale tractului digestiv (cancer de colon, pancreatic şi hepatic) dar şi în cel mamar sau al vezicii urinare;
- AFP - în viaţa intrauterină este secretată de sacul vitelin şi ficatul fetal; reapare în serul bolnavilor cu tumori hepatice, dar şi în afecţiuni non-neoplazice (ciroza hepatică, inflamaţii cronice ale tractului digestiv); concentraţia AFP este utilizată pentru monitorizarea evoluţiei postoperatorii a tumorii sau a tratamentului medicamentos.

Antigene de diferenţiere celulară: pe parcursul diferenţierii celulare normale, în diverse stadii se exprimă diverse antigene de suprafaţă, care pot fi detectate şi pe suprafaţa celulelor tumorale. Tehnicile de diagnostic care utilizează anticorpi monoclonali specifici permit evidenţierea celulelor tumorale şi a stadiului în care a survenit transformarea malignă.

Pentru leucemii acute:

- LLA: CD10 (CALLA - *common acute limphoblastic leucemia antigen*) - forma comună; CD19, TdT(n)* - forma null
- LLA cu preB: CD19, lanţuri μ libere intracitoplasmatic
- LLA cu T:CD3 (citoplasmatic), CD7, TdT(n)
- LMA: CD13, CD33, mieloperoxidaza

Pentru leucemii cronice:

- LLC cu B: CD19, CD21, CD5, CD23

Sindromul Sezary: CD3, CD4

- LLC cu T:CD3, CD8

Markerii tumorali umorali/solubili pot fi clasificaţi în două grupe principale:

- substanţe inactive biologic, care pot fi detectate şi analizate în plasmă/ser sau urină şi sunt utilizate ca markeri pentru prezenţa afecţiunii maligne, purtând denumirea de **„markeri tumorali"**.
- substanţe care alterează metabolismul şi în mod normal produc efecte clinice numite sindroame paraneoplazice; acestea sunt denumite cel mai adesea **„produşi hormonali"**.

* Terminal deoxynucleotidyl transferase (nuclease)

Tabelul 19.I. Markerii tumorali aprobaţi de FDA – 2008

Compusul analizat	Tumora asociată	Indicaţii
	SER / PLASMĂ	
CA15-3, CA27.29	mamară	monitorizare; recurenţe
HER-2 (human epidermal growth factor receptor)	mamară	monitorizare
Celule tumorale circulante	mamară	prognostic în boala metastatică
CA125	ovariană	monitorizare; evaluare secunda
CA72-4	gastro-intestinale	monitorizare
CA19-9	pancreatică	monitorizare
PSA total; PSA complexat	de prostată	diagnostic la barbaţi peste 50 ani coroborat cu tuşeu anal; monitorizare; prognostic
PSA liber	de prostată	diagnostic diferenţial între tumora malignă şi benignă la bărbaţi peste 50 ani, cu PSA total între 4-10 ng/mL şi tuşeu anal nesugestiv
Fosfataza acida prostatică	de prostată	monitorizare
CEA (antigen carcino-embrionar)	colorectală; mamară; pulmonară	monitorizare; prognostic
AFP (alfa-fetoproteina)	testiculară ne-seminală	monitorizare
AFP-L3	hepatocelulară	evaluarea riscului
Des-γ-carboxi protrombina	hepatocelulară	evaluarea riscului
Tireoglobulina	tiroidiană	monitorizare (la pacienţii fără autoanticorpi anti-tireoglobulină)
Soluble mesothelin-related peptides	mezoteliom	monitorizare
	URINĂ	
BTA stat, BTA TRAK (bladder tumor antigen)	de vezică urinară	managementul tumorii, coroborat cu cistoscopia
NMP-22 (nuclear matrix protein)	de vezică urinară	diagnosticul la pacienţii simptomatici sau cu factori de risc; recurenţe
Tumor cell markers (ImmunoCyt)	de vezică urinară	managementul tumorii, coroborat cu citologia urinii şi cistoscopie
	ŢESUTURI	
Receptori de estrogen şi progesteron	mamar	evaluarea probabilităţii unui răspuns favorabil la tratament; prognostic; managemet
HER-2	mamar	identifică pacienţii eligibili pentru tratament cu trastuzumab (Herceptin)
EGFR (epidermal growth factor receptor)	colorectal	identifică pacienţii eligibili pentru tratamentul cu cetuximab
TPA (antigen polipeptidic tisular)	antigen universal asociat tumorilor	indică activitatea actuală a tumorii

19.4. Peptide non-hormonale ca şi indicatori de malignitate - markeri tumorali

Termenul de „marker tumoral" este actualmente utilizat într-un mod mult mai restrâns pentru a indica o substanţă care este sintetizată de către o tumoră şi eliminată în sânge sau urină, unde poate fi determinată. *(Tabelul 19.I şi Tabelul 19.II).*

Markerii care sunt denumiţi curent antigene tumorale sunt de fapt *antigene asociate tumorilor.* Această denumire este inexactă pentru că sunt antigene care intră în reacţie de fapt cu anticorpi provenind de la animale imunizate cu aceste antigene. Sunt cei mai specifici dintre markerii utilizaţi în prezent pentru detectarea neoplaziilor. Cu tehnica anticorpilor monoclonali pot fi determinate noi antigene şi astfel acest grup devine tot mai numeros.

19.4.1 Antigenul carcino-embrionar (CEA)

Este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 180 kD; 45-60% din moleculă este alcătuită din carbohidraţi. A fost identificată in 1965 de Phil Gold si Samuel O. Freedman într-un extras tisular de tumoră de colon. Gena responsabilă

Tabelul 19.II. Markeri tumorali – tabel sinoptic

ŢESUT	TUMORĂ ASOCIATĂ	MARKER TUMORAL	DETERMINĂRI SUPLIMENTARE
SÂNGE	leucemie	Neprilizina (CD10 sau CALLA), imunoglobulina monoclonală, TK, proteina Bence-Jones	TdT(n), β2-mg, feritina
SISTEM LIMFATIC	limfosarcom	CD3, CD79a, vimentina	
SISTEM ENDOCRIN	cancer tiroidian	Tireoglobulina, calcitonina, CEA, NSE	TPA
	tumoră corticosuprarenală	cortizol	Testosteron, estrogen
	feocromocitom	normetanefrina, epinefrina, norepinefrina, enolaza 2	AVM (acid vanil mandelic), HVA (acid homovanilic)
	tumori neuroendocrine	sinaptofizina, cromogranina A, serotonina	acid 5-OH-indol acetic (5-HIAA)
	neuroblastom	HVA,dopamina, NSE	AVM
SISTEM NERVOS	tumoră hipofizară	HCG, ACTH, prolactina	FSH, LH, TSE
	tumoră cerebrală	PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	NSE
	astrocitom	GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)	
	melanom	proteina S-100, MDGRP (Melanoma-derived growth regulatory protein), melanina, feritina, HVA	acid N-acetil-neuraminic (NANA)
SISTEM RESPIRATOR CARDIOVASCULAR	cancer pulmonar	CEA, enolaza 2, factorul motilităţii autocrine / GDI, NSE, TPA, CA 72-4	calcitonina, ACTH, feritina, prolactina, CRP
	hemangiosarcom	factorul VIII al coagulării	
APARAT DIGESTIV	tumoră de esofag	SCC, CEA	CA 19-9
	tumoră gastrică	CA 72-4, CA 19-9, CEA, TPA	gastrina, feritina, prolactina
	cancer colorectal	CA19-9 , CEA, TPA	CA-125, CRP, NANA
	tumoră pancreatică	CA19-9, CEA, CA 242, CA 72-4, TPA	gastrina, glucagon
	carcinom hepatocelular	AFP, AFP-L3, CEA, CA-125	CA 19-9, feritina, enzime hepatice
	gastrinom	gastrina	
	glucagonom	glucagon	
	insulinom	insulina	peptidul C

pentru sinteza CEA a fost identificată în 1986 pe cromozomul 19 şi ulterior a putut fi clonată. La om această genă se transcrie sub forma unui ARN_m de 3100 de baze care este translatat pentru a sintetiza o proteină cu greutatea de 70 kDa. Prin glicozilare se ajunge la greutatea totală de 180 kDa. Structura proteică include un domeniu N-terminal, o regiune hidrofobă C-terminală şi trei domenii identice de 178 de aminoacizi legate prin punţi disulfidice. Această structură încadrează CEA în superfamilia imunoglobulinelor.

CEA se diferenţiază de ceilalţi membrii ai familiei din care face parte prin faptul că foloseşte o fracţiune a glicozil fosfatidilinozitol-ului pentru a se ataşa de membrana celulară.

S-au descris cel puţin 6 epitopi. Heterogenitatea biochimică este cauzată de conţinutul variabil în glucide.

În timpul dezvoltării embrionului, se formează în pancreas şi în tractul gastrointestinal ca un antigen de suprafaţă celulară. La adult, sinteza nu încetează complet.

Valori normale: 0-4,6 ng/mL.

Timpul de înjumătăţire în ser : 1-2 săptămâni.

Fumători : < 10 ng/mL.

CEA este produs în anumite tumori maligne, în special în carcinoamele colo-rectale. Totuşi, trebuie spus că nivele crescute au fost depistate într-o varietate mare de afecţiuni non-maligne, cum ar fi afecţiuni inflamatorii ale peretelui intestinal, hepatită, pancreatită, ciroză alcoolică, insuficienţă renală, bronşită şi chiar la fumători. În ciuda nespecificităţii acestuia, dacă concentraţia iniţială plasmatică este crescută, dozări seriate pot fi utilizate pentru a estima eficienţa terapiei. Concentraţia plasmatică a

Tabelul 19.II. (continuare)

APARAT REPRODUCATOR URINAR GLANDE MAMARE	tumoră de col / corp uterin	CA 125, CEA, TPA, CA 19-9	HCG, CRP
	tumoră ovariană	CA 125, CD30, hCG, AFP, LDH, inhibina, CA 72-4, CA 19-9, TPA, CEA	HCG, AFP, CRP, progesteron
	cancer testicular	βhCG , AFP/AFP-L3 • CD30	NSE
	cancer de prostată	PSA, fosfataza prostatică acidă, glutamat-carboxipeptidaza II, receptorul erbB-3, EPCA-2 (antigenul precoce al cancerului de prostată 2), GOLPH2 (Golgi membrane phosphoprotein), PCA3 (Prostate cancer antigen), PAP	CEA, TPA, feritina
	tumora cu celule germinale	NANOG, AFP, HCG / βHCG	HPL, progesteron, feritina, CEA, TPA,prolactina,estradiol
	cancer renal	eritropoietina, renina	CEA, TPA
	cancerul vezicii urinare	receptorul erbB-3, NMP22	CRP
	tumoră mamară	CA 15-3, receptorul erbB-2, receptorul erbB-3, catepsina D, CEA, TPA	feritina, HCG, CRP, IgE
TUMORILE CAPULUI ŞI GÂTULUI	carcinoame ale capului şi gâtului	CEA, TPA	IgE, ferinina, NANA
MUSCULO-SCHELETAL	rabdomiosarcom	desmina	
SISTEMUL OSTEO-ARTICULAR	sarcom osteo-articular	izoenzima AP, hidroxiprolina, TPA, CEA	PTH
HISTOLOGIE GENERALĂ	sarcom	vimentina	
	carcinom (epitelial)	citokeratina	

markerului se corelează destul de slab cu masa tumorală; totuşi, concentraţii foarte crescute indică de obicei o prognoză rezervată.

Valori crescute se întâlnesc în carcinom colorectal, pancreatic, gastric, pulmonar, mamar, cervical, ovarian. În bolile benigne şi la fumători valorile CEA nu depăşesc 10 ng/mL în 80% din cazuri. Preoperator, valorile CEA în ser au o valoare diagnostică limitată (*Tabelul 19.III).*

- sub 10 ng/mL: nu are specificitate din cauza interferenţei cu bolile non-maligne.
- intervalul 10-20 ng/mL: există riscul unui proces malign
- peste 20 ng/mL: indică cu o mare probabilitate un proces malign.

Tabelul 19.III. Sensibilitatea CEA în tumorile primare

Tumori primare	Sensibilitate (%)
Carcinom pulmonar cu celule mici	60-70
Carcinoame pulmonare altele decât cele cu celule mici	75-85
Cancer mamar preoperator	40-95
Cancer mamar postoperator	75-85
Ficat	30-40
Pancreas	30-40
Carcinom colo-rectal preoperator	10-85
Carcinom colo-rectal postoperator	65-75
Vezică urinară	<10
Prostată	<10
Ovar	20-30
Tiroidă	<10
Cap, gât	60-80

CEA nu este capabil să localizeze exact tumora. Sensibilitatea scade în următoarea ordine: carcinom colo-rectal, pancreatic, pulmonar, mamar, alte tumori gastrointestinale, ginecologice, tiroidiene.

Prezenţa în urină a unei concentraţii de peste 35 ng/mL (dacă infecţia urinară este exclusă) poate indica un carcinom al vezicii urinare. Tumorile colonului, prostatei, rinichilor se însoţesc de valori crescute de CEA în urină numai după invadarea tractului urinar.

Valori crescute de CEA în lichidul cefalorahidian apar în primul rând în metastaze cerebrale. Persistenţa valorilor patologice postoperator indică o tumoră reziduală. Normalizarea valorilor după operaţie, urmată după o scurtă perioadă de timp de o creştere rapidă a valorilor indică prezenţa metastazei (*Tabelul 19.IV).*

Antigenul carcino-embrionar exprimat pe suprafaţa celulelor neoplazice este considerat unul din fac-

Tabelul 19.IV. Sensibilitatea CEA în metastaze

Locul metastazei	Sensibilitate (%)
Multiple	87
Ficat	71
Oase	57
Plămâni	56
Peritoneu	33
Sistem limfatic	11

torii care precipită apariţia determinărilor secundare hepatice în cazul tumorilor colorectale, probabil datorită rolului în adeziunea celulară deţinut de CEA.

Iniţial, anticorpii monoclonali direcţionaţi împotriva CEA au fost concepuţi în scop diagnostic, pentru realizarea coloraţiei imunohistochimice a specimenelor tisulare prelevate. Astăzi se foloseşte arcitumomab-ul - fragmentul Fab' al anticorpului monoclonal IgG_1 (IMMU-4) murin - un anticorp monoclonal, pentru depistarea structurilor anatomice cu concentraţii ridicate de CEA. Cuplarea acestor anticorpi cu un izotop radioactiv au făcut posibilă localizarea celulelor tumorale *in vivo*. Ataşarea unor molecule citotoxice cum sunt radionuclizii, toxinele sau agenţii chimioterapici au deschis o nouă eră în tratamentul cancerului – terapia ţintită. În prezent noile cercetări de biologie moleculară şi imunologie au propus utilizarea acestui marker tumoral ca ţintă în vederea dezvoltării unor vaccinuri şi chiar ca ţintă propriu-zisă în vederea limitării metastazării celulelor neoplazice.

19.4.2 Alfa-Fetoproteina (AFP)

Este o glicoproteină cu masa moleculară 70 kDa (conţine 4% carbohidraţi) de origine oncofetală, sinteza ei fiind suprimată la adult. Gena codificatoare a acestei proteine este localizată pe cromozomul 4. Este considerată proteina omoloagă albuminei serice în sângele fetal, având rolul de a lega estradiolul. AFP nu are nici o funcţie cunoscută la adult. În cursul vieţii intrauterine se formează în sacul vitelin, iar mai târziu în ficat. În ficatul fătului sinteza maximă are loc în săptămânile 14-20. De aici ajunge în serul mamei şi atinge concentraţia maximă în săptămânile 35-38 de sarcină.

Raportul normal al concentraţiei de AFP în serul fetal : lichidul amniotic: serul matern este de 10.000 : 100 : 1. Devierile de la aceste valori indică o sarcină patologică. Postnatal sinteza de AFP este minimă, adultul sănătos având în ser o concentraţie maximă de 20 ng/mL.

Acest marker este determinat în sângele sau lichidul amniotic al pacientelor însărcinate pentru screening-ul anomaliilor de dezvoltare intrauterină a fătului. Are valori *crescute* în defectele de închidere a tubului neural şi în omfalocel şi *scăzute* în sindromul Down.

Valori normale: < 7 ng/mL (< 3,5 U/mL) la adult.

Valori crescute: carcinom hepatic, ciroză biliară, 2-4 mg/mL la făt, < 0,05 mg/mL la femeia gravidă.

Timpul de înjumătăţire: 5 zile.

Bolile maligne sau inflamatorii ale celulelor care în perioada embrionară au secretat AFP sunt însoţite de o sinteză crescută de AFP. Este vorba în primul rând de hepatocite (boli inflamatorii sau maligne ale ficatului) şi de celule germinale (boli maligne). Secreţia AFP poate fi foarte crescută în plasma pacienţilor cu tumori hepatice, sau cu tumori cu celule germinale: carcinoamele hepatocelulare, hepatoamele primare, hepatoblastoamele şi de asemenea în teratoame. Creşteri moderate ale concentraţiei acesteia au fost observate în afecţiunile hepatice non-maligne, cum ar fi hepatitele cronice sau ciroza hepatică. Aşadar concentraţii crescute ale acesteia nu sunt absolut specifice tumorilor hepatice, dar sunt sugestive. Dozarea nivelului acesteia este utilă pentru a determina răspunsul la tratament.

AFP creşte moderat în următoarele boli maligne: neoplazii testiculare, ovariene, retroperitoneale, mediastinale şi în următoarele boli non-maligne: hepatita alcoolică, ciroza hepatică, hepatita acută virală, hepatita cronică activă (*Tabelul 19.V*).

În contextul medicinei bazate pe dovezi este confirmat faptul ca AFP este un marker valoros pentru pacienţii cu *tumoră non-seminomatoasă cu celule germinale*.

Tabelul 19.V. Nivelul AFP în diverse afecţiuni tumorale şi non-tumorale

AFP (ng/ml)	<10	10-215	215-7500	>7500
Persoane sănătoase	~100%			
Ciroza hepatică/hepatita	~80%	~15%	~5%	
Carcinoame extrahepatice cu metastaze hepatice	~65%	~30%	~5%	
Carcinoame primare hepatocelulare	~5%	~10%	~35%	~50%

19.4.3 Des-gamma carboxi-protrombina (DγCP)

Se mai numeşte PIVKA-II - "*protein induced by vitamin K absence or antagonist-II*" şi este o formă patologică a protrombinei. În mod normal precursorii protrombinei suferă un proces de carboxilare posttranslaţională la nivel hepatic înainte de a fi eliberaţi în plasmă. În cazul DγCP acest lucru nu se întâmplă. Această proteină poate fi detectată la pacienţi cu deficienţă de vitamina K sau la cei aflaţi sub tratament cu warfarină (inhibitor al acţiunii vitaminei K). Prezenţa DγCP a fost identificată la peste 90% din pacienţii cu *carcinom hepatocelular* în timp ce pacienţii cu alte afecţiuni hepatice nu prezintă nivele detectabile. Concentraţia serică a DγCP nu se modifică după administrarea de vitamina K, sugerând un defect de carboxilare şi eliminând posibilitatea unei deficienţe de vitamina K. DγCP poate fi folosită ca marker tumoral, având o sensibilitate şi o specificitate înaltă pentru carcinomul hepato-celular. În acelaşi timp poate diferenţia carcinomul hepatocelular de afecţiunile non-maligne ale ficatului.

Valori normale: 0,0 – 7,4 ng/mL

19.4.4 Antigenul gastro-intestinal CA19-9

Este un gangliozid (glicolipid) descoperit în 1981 la pacienti cu tumora de colon si de pancreas. Este prezent numai la persoanele cu antigenele de grup sanguin Lewis prezente. Persoanele cu grup sanguin relativ rar Lewis-(a) Lewis-(b) (3-5% din populaţie) nu dispun de enzima sialyltransferaza necesară pentru sinteza CA19-9. La aceste persoane CA19-9 rămâne la valori foarte scăzute chiar dacă este prezentă o neoplazie, markerul tumoral recomandat fiind CA50. CA19-9 este prezent în celulele epiteliale şi mucoase în: stomac, intestin, pancreas, ficat.

Valori normale: 0-37 U/mL.

Timp de înjumătăţire: 4-6 zile.

Intervalul de graniţă: 37-100 U/mL, poate fi întâlnit atât la persoane cu boli benigne, cât şi cu boli maligne. La valori > 63 U/mL probabilitatea ca boala să fie de natură malignă este de 95%.

Deşi CA19-9 are o sensibilitate mare în cazul carcinomului pancreatic, *Societatea Americana de Oncologie Clinică* nu recomandă întrebuinţarea acestui biomarker pentru diagnosticul tumorilor pancreatice. Motivul este numărul mare de rezultate fals negative (testul arată un nivel normal de CA19-9, chiar dacă pacientul are tumoră) şi rezultate fals pozitive (nivel ridicat la pacienţi fără afecţiuni maligne). Principala

Tabelul 19.VI. Sensibilitatea CA 19-9 în diverse afecţiuni tumorale

Tumorile	Sensibilitatea (%)
Pancreas	70-95
Căi biliare	55-75
Colon	60
Ficat	50
Stomac	60
Plămâni	15
Glanda mamară	14

Tabelul 19.VII. Specificitatea CA 19-9

Boala	Valori crescute (%)
Ciroză hepatică	12
Colecistită	25
Pancreatită	18
Apendicită	11
Hernie	3

Tabelul 19.VIII. Sensibilitatea CA72-4

Tumori	Sensibilitate (%)
Gastric	78
Ovarian (mucinos)	82
Pulmonar (altele decât cele cu celule mici)	72

Tabelul 19.IX. Specificitatea CA72-4

Boli benigne	Valori crescute (%)
Stomac	4
Ovar	4
După menopauză	3

întrebuinţare recomandată pentru acest marker este verificarea eficacităţii tratamentului. Pentru aceasta se va verifica înaintea administrării tratamentului dacă tumora respectivă secretă acest marker. Apoi se va urmări nivelul acestuia pe tot parcursul tratamentului şi după ce terapia antitumorală a fost oprită pentru a detecta o posibilă recurenţă. În alte boli maligne prezintă o sensibilitate mai scăzută (*Tabelul 19. VI*).

Specificitatea (*Tabelul 19.VII*) este însă semnificativ mai mare în comparaţie cu CEA.

Este întâlnit şi într-o serie de patologii non-tumorale cum ar fi sindromul Mirizzi (complicaţie rară a litiazei biliare, cu obstrucţia căii biliare comune şi semne clinice de icter obstructiv) şi alte afecţiuni ale ductelor biliare şi ale ficatului. Ca o curiozitate, în

Tabelul 19.X. Sensibilitatea şi specificitatea comparativă a CA72-4, CA19-9, CEA în afecţiuni gastrice

	CA72-4 > 8 ng/ml	CA19-9 > 37 U/ml	CEA > 5 ng/ml
Carcinom	78%	60%	51%
Boli benigne	1%	7%	9%

Tabelul 19.XI. Corelaţia între valorile crescute ale CA72-4, CA19-9, CEA şi stadiul tumorii gastrice

Stadiul	CA72-4 > 8 ng/ml	CA19-9 > 37 U/ml	CEA > 5 ng/ml
I	14%	4%	1%
II	28,5%	12,5%	12,548%
III	64%	46%	32%
IV	85%	70%	65%

anul 2003 a fost prezentat cazul unei paciente în vârstă de 52 de ani care prezenta nivele crescute de CA 19-9 (1432 UI/mL) după ce consumase în ultimele luni aproximativ 1,5-2 L/zi de ceai negru. S-a prezentat la medic cu dureri epigastrice, anorexie şi scădere ponderală. Examenul obiectiv şi testele paraclinice nu au decelat modificări. După întreruperea consumului de ceai simptomele au dispărut, iar CA 19-9 a revenit la normal [22].

Un studiu realizat de o echipă de medici chinezi propune utilizarea CA19-9 pentru stabilirea operabilităţii neoplasmului pancreatic. La valori peste 353 U/mL tumora pancreatică s-a dovedit a fi inoperabilă (sensibilitate = 93,1% şi specificitate = 78,3%). În acelaşi timp pentru pacienţii cu cancer pancreatic metastazant, nivelul de CA 19-9 (alături de nivelul bilirubinei totale) poate fi folosit pentru a oferi un prognostic legat de supravieţuirea la un an [27].

19.4.5 Antigenul gastro-intestinal – CA 72-4

Este o glicoproteină cu masă moleculară de 400 kDa, prezentă în stomac, ovare, celule epiteliale pulmonare. A fost identificat folosind 2 anticorpi monoclonali (CC49, B72.3).

Valori normale: 0-8 ng/mL.

Timp de înjumătăţire: 4-6 zile

Este indicat în carcinom colo-rectal, gastric, ovarian, endometrial, mamar şi adenocarcinom pulmonar (*Tabelul 19.VIII şi 19.IX*). În cancerul gastric are o sensibilitate şi specificitate semnificativ mai mare decât CEA şi CA19-9 (*Tabel 19.X*).

Există o corelaţie mai exactă între CA 72-4 şi stadiile bolii, comparativ cu valorile CEA şi CA19-9 (*Tabelul 19.XI*).

CA 72-4 poate fi folosit pentru monitorizarea carcinomului gastric postoperator pentru că indică devreme recidiva bolii.Nivelul său poate fi crescut şi în alte afecţiuni non-maligne cum ar fi pancreatita. Diabetul zaharat nu influenţează nivelul CA 72-4.

19.4.6 Antigenul tumorilor mamare – CA 15-3

Este o glicoproteină de tip mucinos cu masa moleculară de 300-400 kDa, prezentă în celulele epiteliale secretorii şi în secreţii, codificată de gena MUC1. A fost identificat cu 2 anticorpi monoclonali diferiţi: 115D8 şi DF3. Anticorpul 115D8 a fost obţinut prin imunizare cu lipide din laptele uman, iar anticorpul DF3 prin imunizare cu lipide din membrana celulelor de carcinom mamar.

Valori normale: 0-22 U/mL

Timpul de înjumătăţire: 4-6 zile

Are o sensibilitate semnificativ mai mare în comparaţie cu CEA în detectarea carcinomului mamar aflat în diferite stadii (*Tabelul 19.XII*), dar specificitatea la valori sub 40 U/mL este discutabilă (*Tabelul 19.XIII*).

Peste 40 U/mL probabilitatea neoplaziei este de 80%. CA 15-3 este folosit pentru monitorizare postoperatorie pentru că indică recidiva cu câteva luni înainte ca diagnosticul clinic să fie posibil (*Tabelul 19.XIV*). „*Lead time*" este perioada de timp care trece de la prima creştere a concen-

Tabelul 19.XII. Sensibilitatea CA 15-3 şi CEA în diverse stadii ale carcinomului mamar

Stadiul bolii	CA15-3 > 25U/ml (%)	CEA > 5 U/ml (%)
T1	25	9
T2	32	11
T3+T4	35	14
Media:	30	11
Metastaze		
Locale	46	12
Osoase	79	44
Hepatice	79	75
Media:	69	41

Tabelul 19.XIII. Specificitatea CA 15-3

Concentraţia CA15-3 (U/ml) în alte boli benigne şi maligne: CA15-3 (%)						
	>22	>25	>30	>35	>40	media +/- ds
Persoane sănătoase	9,4	5,5	1,3	0,5	0,09	13,3+/-6
Hepatita acută	63	50	38	25	0	24,7+/-10
Hepatita cronică	57	43	29	29	14	25,4+/-13
Ciroză	39	39	31	27	23	26,8+/-19
Boli maligne						
Stomac	14	7	7	7	7	20,5+/-30
Ficat	36	28	21	14	14	44,2+/-124
Pancreas	80	80	70	70	50	51,2+/-53
Prostată	100	50	30	28	20	26,2+/-11
Plamâni	71	71	60	53	40	63,6+/-76
Ovare	66	64	55	39	34	59+/-64

Tabelul 19.XIV. Valoarea CA 15-3 în monitorizarea postoperatorie

Cut-off (U/ml)	Valori crescute înainte de diagnostic (%)	Valori în momentul diagnosticului (%)	„Lead time" maxim (luni)
25	70	76	9
40	63	76	7

traţiei markerului şi până când detectarea clinică a recăderii devine posibilă.

Mai recent acest marker a fost folosit (coroborat cu alte variabile clinico-patologice) ca factor de prognostic al răspunsului la terapie şi al intervalului de timp până la apariţia recurenţelor în *boala canceroasă mamară avansată local*. S-a observat că valori crescute de CA 15-3 se corelează cu un răspuns slab la chimioterapie. Mai mult, nivele persistent crescute de CA 15-3 după chimioterapie, conjugate cu invazia limfatică şi expresia crescută a genei HER2 în ţesutul tumoral se corelează cu o rată înaltă de apariţie a recurenţelor.

19.4.7 Receptorul 2 al factorului de creştere epidermic (Human Epidermal growth-factor Receptor 2)

Se mai numeşte ErbB-2, HER-2/neu sau CD340 şi este o proteină care amplifică agresivitatea cancerului mamar. Face parte din familia receptorilor tirozin-kinazici pentru factorul de creştere epidermic. Se găseşte pe suprafaţa celulară şi este implicat în creşterea şi diferenţierea celulelor. Gena HER2/neu care codifică această proteină este o proto-oncogenă localizată pe braţul lung al cromozomului 17. Expresia acestei gene este reglată de receptorii pentru estrogeni. *Tamoxifenul* (antagonist al receptorilor pentru estrogeni) are un efect de down-regulation asupra genei HER2. În situaţia în care coactivatorul AIB-3 este preponderent faţă de corepresorul PAX2, tamoxifenul va avea un efect de up-regulation asupra HER-2, ceea ce induce rezistenţa celulelor tumorale la efectul antiestrogenic al tamoxifenului.

Aproximativ 15-30% din cancerele mamare prezintă o amplificare a genei HER-2 sau o supraexpresie a produsului său proteic, ceea ce se asociază cu o rată mai mare a recurenţelor şi cu un prognostic mai rezervat. Tumorile mamare HER-2 pozitive au tendinţa să crească şi să metastazeze mai repede decât alte cancere mamare. Toate cazurile nou-diagnosticate de cancer mamar ar trebui testate pentru HER-2. Cele HER-2 pozitive au o probabilitate mai mare de a răspunde la tratamentele care acţionează împotriva receptorului HER-2 de pe suprafaţa celulelor canceroase mamare. Acest receptor este ţinta anticorpului monoclonal umanizat *Trastuzumab* (herceptin). Acesta este folosit cu succes în terapia ţintită a cancerelor mamare care prezintă o supra-expresie a genei HER2. Unul din mecanismele prin care acţionează trastuzumabul după legarea de HER-2 este creşterea cantităţii de proteină *p27* a cărei rol este de a stopa proliferarea celulară. Un alt anticorp monoclonal care acţionează pe receptorul HER-2 este *Pertuzumab,* care în prezent se află în faza de studii clinice. Standardul

de aur pentru identificarea pacienţilor care ar beneficia de un tratament cu Trastuzumab este evidenţierea genei HER-2/neu prin FISH (Fluorescent in situ hybridization). Expresia amplificată a acestei gene poate fi întâlnită şi în alte afecţiuni maligne: tumori ovariene, tumori gastrice, tumori uterine (carcinom endometrial seros). Nivelul de HER-2/neu se va determina prin analiza unor probe tisulare prelevate din masa tumorală.

19.4.8 Antigenul ovarian – CA 125 (Carbohydrate Antigen 125)

CA125 este o glicoproteină cu masa moleculară de 200 kDa. CA125 a fost identificat cu un anticorp monoclonal (OC 125). CA125 II de a doua generaţie a fost identificat cu un alt anticorp (M 11), care a crescut semnificativ specificitatea acestui marker (specificitate 95%). Această glicoproteină rezultă din glicozilarea masivă a unei mucine (mucina 16), care la oameni este codificată de gena MUC16 de pe cromozomul 19.

Structural, CA125 este alcătuit dintr-un capăt N-terminal (format de 12070 aminoacizi, bogat în resturi de serină/treonină), un domeniu central (conţine peste 60 de unităţi repetitive de 156 aminoacizi fiecare) şi un capăt C-terminal (conţine 284 de aminoacizi şi are o porţiune extracelulară, una transmembranară şi o prelungire citoplasmatică). Epitopii recunoscuţi de anticorpii anti CA125 folosiţi în prezent (OC125 şi M11) sunt localizaţi pe un inel cisteinic din regiunea repetitivă centrală.

CA-125 este prezent în epiteliul următoarelor ţesuturi şi organe: conjunctivă, cornee, urechea medie, trahee, bronşii, ovar, pancreas, vezica biliară, stomac, rinichi, colon. Se găseşte în cantităţi crescute în lichidul amniotic, laptele şi serul femeilor însărcinate.

Este cel mai bun marker tumoral existent în prezent pentru detectarea carcinoamelor ovariene seroase şi nediferenţiate. Sensibilitatea în stadiile I şi II este în medie de 65%; în stadiile III si IV de 85%. În cazul tumorilor mucinoase, care reprezintă aproximativ 10% din carcinoamele ovariene, sensibilitatea este mai mică; de aceea în aceste cazuri este mai sigură combinarea CA125 cu CA72-4.

În vederea folosirii acestui marker ca test de *screening* pentru neoplasmul ovarian, se poate determina nivelul de CA125 combinat cu ultrasonografia trans-vaginala. Astfel se va obţine o sensibilitate şi specificitate mai mare a testului. Mai recent s-a conceput un algoritm de determinare a riscului pentru cancer ovarian (ROCA – the Risk of Ovarian Cancer Algorithm) bazat pe următoarele observaţii:

- Pacienţii cu tumori benigne au, în general, niveluri constante de CA125, chiar dacă acestea sunt crescute.
- În cazul pacienţilor cu cancer ovarian nivelurile de CA125 sunt progresiv crescânde. Astfel, dacă se fac determinări seriate ale nivelurilor de CA125 se va obţine o sensibilitate crescută.

Valori normale: 0-35 U/mL
Interval de graniţă: 35-65 U/mL
Timpul de înjumătăţire în ser: 2-6 zile

Specificitatea corespunde cerinţelor: cazurile fals pozitive apar în grupul de control sănătos cu o frecvenţă de 1%, iar în grupul de boli benigne cu o frecvenţă de 5-10%.

Sensibilitatea este mai scazută (30-40%) în cazul tumorilor ginecologice non-ovariene (endometru, col uterin, vagin).

Cauza frecventă a rezultatelor fals pozitive este endometrita, diabetul zaharat, ciroza hepatică, insuficienţa renală cronică.

Este indicat mai ales pentru monitorizarea evoluţiei bolii şi a terapiei. Dacă nivelul CA125 rămâne în mod constant peste 100 U/mL şi/sau dacă două testări succesive arată o creştere cu 50% a concentraţiei acestui marker, atunci probabilitatea ca boala să fie progresivă este de >90%.

Studii mai noi arată că CA125 este crescut în sindroamele coronariene acute şi în disfuncţia sistolică sau insuficienţa cardiacă acută. Nivelul de CA125 creşte în concordanţă cu nivelul BNP (*B-type natriuretic peptide* sau *brain natriuretic peptide*). Mai mult, pentru a diagnostica edemul pulmonar se poate determina nivelul de CA125 combinat cu BNP. În acest caz testul are o acurateţe de 83% faţă de 49% în cazul în care se determină doar BNP [11].

19.4.9 Antigenul specific prostatic – PSA

Este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 30-34 kDa fiind asemănătoare structural cu kalikreinele glandulare. Este sintetizată de celulele epiteliale prostatice şi secretată în lichidul seminal. Are funcţia unei serin-proteaze. Activitatea proteolitică a PSA în sânge este inhibată prin formarea unor complexe ireversibile cu inhibitori de protează (alfa-1-antichimotripsina, alfa-2-macroglobulina şi alte proteine de fază acută). Aproximativ 30% din PSA circulant există în formă liberă, dar este inactiv. În ceea ce priveşte controlul secreţiei de PSA, un rol decisiv îl au hormonii androgeni. Efectele celulare ale an-

Tabelul 19.XV. Valorile normale ale PSA seric total în funcţie de vârstă

Vârsta (ani)	Concentraţii serice (ng/mL)
<40	<1.4
40-49	<2.0
50-59	<3.1
60-69	<4.1
>70	<4.4

Tabelul 19.XVI. Probabilitatea de existenţă a unui cancer pe baza valorilor PSA şi a fracţiunii fPSA

PSA (ng/mL)	Probabilitatea unui cancer (%)	fPSA (%)	Probabilitatea unui cancer (%)
0–2	1	0–10	56
2–4	15	10–15	28
4–10	25	15–20	20
>10	>50	20–25	16
		>25	8

drogenilor sunt mediate de receptorii acestora. În 1978 Shain and Boesel au arătat că receptorii citoplasmatici ai androgenilor la celulele prostatice hiperplazice canine erau de 4-6 ori mai numeroşi decât în celulele prostatice normale [20].

Datorită faptului că PSA este prezent şi în glandele para-uretrale, anale şi ţesutul mamar (şi tumorile maligne derivate din acestea) nivele scăzute pot fi detectate şi în serul femeilor. PSA poate fi detectat şi după prostatectomie radicală. În principal nivelul PSA este folosit pentru monitorizarea evoluţiei bolii sau a eficienţei terapeutice la pacienţi cu *carcinom de prostată*. Scăderea concentraţiei PSA până la nivele nedetectabile este un indicator al succesului terapeutic.

Valori normale: 0-2,5 ng/mL, iar cut-off: 4 ng/mL.

Timp de înjumătăţire: 1-2 zile.

Valori crescute apar în boli benigne (prostatită, hipertrofie de prostată) şi în carcinom de prostată.

Inflamaţia sau traumatismul prostatei (în cazul retenţiei urinare, prin tuşeu rectal, cistoscopie, colonoscopie, biopsie transuretrală, tratament laser sau ergometrie) pot determina creşterea nivelului de PSA. PSA poate fi crescut la pacienţii vârstnici şi 1-2 zile după ejaculare.

Este un marker tumoral clasic cu o sensibilitate înaltă, dar specificitate redusă, propus pentru screening-ul cancerului de prostată, în special la grupa de vârstă peste 50 de ani. Se estimează că tumora prostatică este răspunzătoare astăzi de doar 9% din decesele cauzate de cancer datorită diagnosticării timpurii şi a tratamentului eficace. Cu cât este mai extinsă folosirea PSA cu atât este mai mare rata diagnosticării cancerului prostatic într-un stadiu incipient şi mai mică rata deceselor.

Cut-off-ul nivelului seric al PSA este 4 ng/mL (*Tabelul 19.XV*).

Majoritatea medicilor consideră că nivele ale PSA sub 4 ng/mL se corelează cu o probabilitate scăzută a existenţei unui cancer de prostată. Valori peste 10 ng/mL de obicei indică prezenţa unei afecţiuni maligne prostatice. Intervalul de valori cuprins între 4 şi 10 ng/mL poartă numele de zonă gri (gray zone) . Doar 25% din pacienţii cu nivele ale PSA în această zonă de graniţă au cancer prostatic.

Un test util atunci când nivelele PSA sunt situate în zona de graniţă (4-10 ng/mL) este măsurarea PSA liber (*free PSA*) sau procentul de PSA liber. PSA se găseşte în sânge în două forme : legat de proteine transportoare sau liber. Cu cât procentul de fPSA (free PSA) este mai mare cu atât probabilitatea unei afecţiuni maligne este mai mică. Dacă fPSA reprezintă mai mult de 25% din valoarea PSA total, probabilitatea existenţei unui cancer prostatic este redusă. Un procent de fPSA sub 10% arată o probabilitate mare a afecţiunii maligne şi impune efectuarea unei biopsii (*Tabelul 19.XVI*).

Screening-ul cancerului prostatic folosind PSA are specificitate scăzută, având ca rezultat un număr de biopsii care nu sunt necesare. Unii clinicieni consideră utilă monitorizarea în timp a evoluţiei nivelului seric al PSA. Aceasta poartă numele de velocitate PSA (viteza cu care creşte nivelul seric în timp). Pentru a determina acest parametru se va măsura concentraţia PSA de cel puţin 3 ori într-o perioadă de 18 luni. Velocitatea PSA poate fi folosită pentru identificarea precoce a stărilor cu risc vital înainte ca tratamentul local (chirurgical, radioterapie) să fie depăşit. Velocitatea PSA este considerată un indicator al evoluţiei bolii către o afecţiune ameninţătoare de viaţă. Bărbaţii cu o velocitate a PSA peste 2 ng/mL/an au risc semnificativ mai mare de mortalitate din cauza unei afecţiuni maligne prostatice comparativ cu pacienţii care au oricare din ceilalţi factori de risc înalt.

Deşi radioterapia sau prostatectomia sunt metode eficiente de tratament, nivelul PSA poate creşte în medie cu 30-40% în primii 10 ani. Aceste creşteri sugerează persistenţa unui număr de celule maligne, în ciuda efectuării acestor tratamente. Din

acest motiv biopsia prostatică este recomandată după radioterapie pentru a identifica boala locală persistentă, în vederea administrării unui tratament de salvare înaintea dezvoltarii metastazelor.

Pacienţii pot fi incluşi în clase de risc (înalt sau scăzut) pentru dezvoltarea cancerului de prostată şi prin screening-ul unui set de gene pe baza statusului metilării acestora. Pentru a demonstra această metodă, au fost colectate probe de urină după masaj prostatic de la *pacienţi cu cancer prostatic localizat* la care urmează să se efectueze prostatectomia radicală şi de la *persoane sănătoase*. Urina a fost folosită pentru a extrage ADN care ulterior a fost supus unor examinări cantitative folosind PCR în timp real specifică pentru metilarea aberantă a unor gene (*Methylation Specific PCR*). Patru gene (GSTP1, RASSF1a, APC şi RARB2) au prezentat o metilare aberantă semnificativă statistic în lotul pacienţilor cu cancer faţă de lotul martor. Sensibilitatea şi acurateţea testului care foloseşte setul de gene menţionat este de 86% şi respectiv 89%, constituind o metodă fezabilă de clasificare a pacienţilor în grupe de risc (scăzut/înalt) pentru prezenţa cancerului. Acest test necesită însă validarea în cadrul unor studii mari de cohortă în ceea ce priveşte specificitatea, reproductibilitatea şi cost-eficienţa.

19.4.10 CYFRA 21-1

Este o subunitate acidă a citokeratinei 19. Citokeratinele sunt proteine de susţinere care, împreună cu filamentele de actină şi microtubulii, formează citoscheletul celular. Această citokeratină face parte dintr-un grup de proteine filamentare intermediare responsabile de integritatea structurală a celulelor epiteliale. Deşi este exprimată în toate ţesuturile organismului, se întalneşte cu precădere în plămâni. Se foloseste pentru a identifica neoplaziile pulmonare (*carcinom pulmonar non -parvicelular*), dar şi alte tumori cu celule scuamoase. Mai poate fi folosit şi pentru a diferenţia tumorile pulmonare maligne de afecţiunile benigne ale plămânului în asociere cu alte date clinice şi radiologice. Spre deosebire de ceilalţi markeri tumorali ai căror epitopi sunt glicoproteine exprimate pe suprafaţa celulară, în cazul CYFRA 21-1 epitopul este o polipeptidă care cel mai probabil este eliberată în circulaţia sanguină după moartea celulei.

Valori normale: < 3,3 ng/mL

Valori crescute: carcinom bronşic non-parvicelular – specificitate 95%.

Se pot întâlni valori crescute şi în unele afecţiuni non-maligne, cum ar fi fibroza pulmonară, ciroza hepatică, insuficienţa renală sau infecţiile pulmonare.

Se pare că CYFRA 21-1 poate oferi informaţii superioare CEA sau CA 15-3, atât în ceea ce priveşte eficienţa terapiei cât şi în diagnosticul recurenţelor din cancerul mamar.

19.4.11 Antigenul celulelor carcinomatoase scuamoase (SCCA)

Este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 45-55 kD, exprimată şi în ţesuturile epiteliale normale. Se găseşte într-un număr de zece fracţiuni proteice cu puncte izoelectrice de la 5,9 până la 6,6. În timp ce forma neutră a SSCA rămâne în interiorul celulei, forma acidă a antigenului este eliberată în circulaţie şi de cele mai multe ori, are valori crescute la pacienţii cu carcinom cu celule scuamoase, sau în alte afecţiuni non-maligne ale ţesuturilor scuamoase. Acest marker tumoral este util pentru diagnosticarea carcinomului cu celule scuamoase. Mai mult de 90% din cancerele capului şi gâtului sunt carcinoame cu celule scuamoase; 80-90% din tumorile invazive de col uterin şi 25-30% din neoplasmele pulmonare sunt carcinoame scuamoase.

Valori normale: < 3 ng/mL

Valori crescute: carcinom uterin, esofagian.

Concentraţii serice crescute ale acestui marker tumoral se întâlnesc şi într-o serie de afecţiuni nonmaligne ale pielii (eczeme, epidermită eritrodermică, pemfigus sau psoriazis) şi plămânilor (TBC, pneumonie, ARDS, sarcoidoză, pleurezie) precum şi în ciroză, hepatită, insuficienţă renală sau boală inflamatorie pelvină. În consecinţă, nivelurile serice ale SCCA trebuie interpretate doar coroborat cu alţi markeri tumorali sau cu date clinice şi imagistice.

19.4.12 Antigenul polipeptidic tisular (TPA)

Este un antigen asociat tumorilor universal, deoarece prezintă valori crescute indiferent de locul tumorii (*Tabelul 19.XVII*). TPA este un polipeptid cu masa moleculară de 180 kDa, fiind de fapt un amestec de citocheratine:

- Citocheratina 19 - 44%;
- Citocheratina 18 - 36%;
- Citocheratina 8 - 30%.

Este prezent în ţesuturile fetale, placentă, epiteliul organelor cavitare.

Sintetizat în membrana celulelor canceroase umane, este secretat activ în lichidele biologice.

Valori normale în ser: 0-90U/L

în urină: <500U/L

Timp de înjumătăţire: 1 zi

Tabelul 19.XVII. Sensibilitatea TPA în diverse tumori maligne

Localizarea tumorii	Sensibilitate (%)
Plămâni - cu celule mici	90-95
Plămâni - altele decât cele cu celule mici	90-95
Mamar – preoperator	40-95
– postoperator	75-85
Ficat	80-90
Pancreas	80-90
Colon, rect – preoperator	10-85
– postoperator	70-80
Vezica urinară	80-90
Prostată	80-90
Ovar	80-90
Tiroidă	40-60
Cap, gât	60-80

Specificitatea este medie/ slabă. TPA creşte frecvent în inflamaţii, infecţii respiratorii, diabet, hepatită, pancreatită, ciroză hepatică. Este folosit şi singur în acele cazuri în care nu există alţi markeri specifici (ex. tumorile vezicii urinare). Combinat cu alţi markeri tumorali, poate creşte semnificativ eficacitatea diagnostică (*Tabelul 19.XVIII*). În contrast cu ceilalţi markeri, a căror concentraţie se corelează cu masa tumorală, TPA indică activitatea actuală a tumorii, de aceea mai este numit şi "antigen de proliferare". TPA este sintetizat în faza S a ciclului celular şi concentraţia TPA se corelează cu proliferarea tisulară. O valoare de peste 120 U/L indică clar un proces proliferativ, care poate fi de natură benignă sau malignă.

TPA arată mai rapid şi mai precis schimbările survenite în procesul malign, fie că este vorba despre monitorizare sau despre terapie. Poate fi identificat în urină, salivă, lichidul de lavaj bronhoalveolar, ascită. Determinările în aceste lichide sunt de multe ori mai valoroase decât determinările din ser. Fragmentele de citocheratină au o sensibilitate diferită în funcţie de locul tumorii.

19.4.13 Antigenul tumoral al vezicii urinare (Bladder Tumor Antigen - BTA)

Se găseşte în urina pacienţilor cu cancer vezical, dar poate fi detectat şi în unele afecţiuni non-maligne cum ar fi litiaza renală sau infecţiile de tract urinar. Testul este unul calitativ, rezultatul fiind pozitiv (BTA prezent) sau negativ (BTA absent). Se poate folosi, coroborat cu NMP22 pentru a diagnostica recurenţa unui cancer vezical. Totuşi valoarea diagnostică şi prognostică a BTA în cazul cancerului vezicii urinare, este inferioară cistoscopiei.

19.4.14 Proteina 22 a matrixului nuclear (Nuclear Matrix Protein 22 - NMP22)

Este o proteină localizată în nucleul celulelor. Nivelele de NMP22 sunt frecvent crescute (peste 10 U/mL) în urina pacienţilor cu cancer al vezicii urinare. Totuşi nu este considerat un marker îndeajuns de sensibil încât să poată fi folosit ca test de screening pentru aceşti pacienţi. Dozarea NMP22 este de ajutor în managementul pacienţilor cu carcinom de tract urinar cu celule tranziţionale. Este utilizat după intervenţia chirurgicală pentru a identifica pacienţii cu boală reziduală sau pe cei care prezintă recurenţe la scurt timp după operaţie. Nivele crescute se pot decela şi în unele afecţiuni non-maligne sau imediat după chimioterapie recentă.

Valori normale: 0,0-10,0 U/mL

19.5 Sistemul endocrin difuz

Unele sindroame rare sunt asociate cu neoplazia unor celule endocrine, sau care secretă substanţe cu proprietăţi de neurotransmiţători dar, datorită faptului că sunt distribuite difuz în ţesuturi de origine non-ectodermică, sunt considerate în mod

Tabelul 19.XVIII. Sensibilitatea TPA în comparaţie cu alţi markeri în câteva tipuri de tumori mai frecvente

	Plamân	Colon, rect	Vezica	Sân
TPA	++++	++++	++++	++++
TPS	+++	++	++	++
CYFRA	++++	+	+	+
CEA	++	+++	++	+
NSE	+++	+	+	+
CA15-3	+	+	+	++
CA19-9	+	++	+	+

Sensibilitate (%):+ = 0-20 , ++= 21-40 ,+++ = 41-60 , ++++ = 61-80

obişnuit ca fiind organe non-endocrine. Multe dintre aceste celule au caracteristici citologice comune cu celulele de origine embrionară ectoblastică. Tehnicile de colorare au arătat proprietatea lor de a prelua precursori aminici şi de a-i decarboxila, cu producerea de amine. De aici denumirea de APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxilation). Tumorile acestor celule au fost denumite "APUD-oame". Multe se dezvoltă în tractul gastro-intestinal şi în pancreas.

19.5.1 Catecolaminele

Ţesutul nervos simpatic, alcătuit din componenta medulară a suprarenalei şi din ganglionii simpatici, derivă din creasta neurală embrionară. Adrenalina este aproape exclusiv producţia medulosuprarenalei în timp ce noradrenalina este produsă de terminaţiile nervoase simpatice. Adrenalina şi noradrenalina sunt formate din acelaşi precursor (tirozina) via dihidroxifenilalanina, DOPA şi dihidroxi-fenilamina (dopamina). DOPA, dopamina, adrenalina şi noradrenalina sunt toate catecolamine.

Adrenalina şi noradrenalina sunt metabolizate ambele spre o formă inactivă, 4-hidroxi 3-metoxi mandelat, adesea denumit şi acid vanilmandelic (AVM). Adrenalina, noradrenalina şi conjugaţii, respectiv metaboliţii acestora, acidul vanilmandelic, pot fi determinate în urină.

Atât adrenalina, cât şi noradrenalina acţionează asupra sistemului cardiovascular. Noradrenalina cauzează vasoconstricţie generalizată cu hipertensiune şi paloare, în timp ce adrenalina dilată vasele sanguine musculare, cu efecte variabile asupra presiunii sanguine. Adrenalina poate cauza hiperglicemie datorită stimulării glicogenolizei şi a altor efecte antiinsulinice.

19.5.1.1 Tumorile secretante de catecolamine

Tumorile sistemului nervos simpatic, fie că aparţin glandei suprarenale, fie că apar în zonele extra-adrenale, produc catecolamine în exces, fiind diferenţiate două tipuri mari, complet diferite, după manifestările clinice ale acestora:

- **Feocromocitoamele** survin în ţesuturile cromafine, 90% aparţinând medularei suprarenale şi aproximativ 10% ţesuturilor extrasuprarenale. Survin mai ales la adulţii tineri şi de obicei sunt non-maligne. Semnele şi simptomele acestora sunt în strânsă relaţie cu concentraţiile crescute în plasmă ale catecolaminelor. Cele mai caracteristice simptome sunt hipertensiunea paroxistică însoţită de anxietate, transpiraţii, dureri de cap, paloare, eritem facial. Hipertensiunea poate fi ocazional persistentă. De asemenea, sunt însoţite de hiperglicemii care pot fi suficient de marcante pentru a produce glicozurie, fenomene care apar concomitent cu puseul paroxistic hipertensiv. Feocromocitoamele sunt cauze rare de hipertensiune, dar sunt curabile prin extirparea chirurgicală a tumorii. Mai ales la persoanele tinere cu hipertensiune arterială, prezenţa feocromo-citomului este prima cauză care ar trebui exclusă.
- **Neuroblastoamele** sunt tumori ale ţesuturilor nervoase, 40% aparţinând medularei suprarenale şi restul ţesuturilor extrasuprarenale. Neuroblastoamele sunt tumori extrem de maligne ale tesutului nervos simpatic, survenind mai ales la copii. Concentraţia plasmatică a catecolaminelor este adeseori mai crescută decât la pacienţii cu feocromocitoame (secretă dopamină), dar simptomatologia clinică descrisă este rară la neuroblastoame.

19.5.1.2 Diagnosticul tumorilor secretante de catecolamine

Tumorile secretante de catecolamine se dezvoltă împreună cu alte anomalii, cum ar fi neurofibromatoza, boala von Recklinghausen sau carcinomul medular tiroidian şi de asemenea cu hiperplaziile paratiroidiene, aşa-numitele neoplazii endocrine multiple de tip II. Diagnosticul chimic al acestor tumori se face, de obicei, prin determinarea în urină a catecolaminelor sau a acidului vanilmandelic (AVM), principalul catabolit al catecolaminelor. O eliminare mai mare decât dublul limitei superioare a normalului poate fi edificatoare pentru acest gen de tumori, dar creşterea uşoară a eliminărilor produsului de catabolism al catecolaminelor poate fi întâlnită în unele forme de hipertensiune arterială esenţială. O mulţime de componenţi alimentari sau medicamentoşi pot afecta determinarea AVM (consumul de banane, ciocolată, cacao, ceai, cafea, vanilie, sucuri de fructe, gemuri şi jeleuri, guma de mestecat, alte produse alimentare cu coloranţi sau edulgoranţi). Se recomandă analiza urinei imediat după atacurile paroxistice de hipertensiune şi repetarea testului la nevoie. Tehnicile imagistice, cum ar fi tomografia computerizată sau rezonanţa magnetică nucleară sunt extrem de utile pentru localizarea proliferării maligne.

19.5.2 Sindroamele carcinoide

19.5.2.1 Metabolismul normal al serotoninei (5-hidroxi triptaminei)

O categorie aparte de celule, denumite argentafine (datorită faptului că se colorează cu săruri de argint), există în mod normal în țesuturi care derivă din tractul intestinal embrionar. Acestea se găsesc din abundență în peretele ileonului şi apendicelui, dar sunt distribuite şi în pancreas, în peretele colonului şi la nivelul rectului. Ele sintetizează amine active biologic, cum ar fi serotonina (5-hidroxitriptamina) din precursori aminici - în cazul serotoninei acesta fiind triptofanul. Triptofanul se transformă printr-un intermediar hidroxilat, 5-hidroxitriptofan, urmat de o dezaminare oxidativă catalizată de monoaminoxidaza (MAO), în acid 5-hidroxiindolacetic (5-HIAA). Acesta este forma principală de eliminare urinară a produşilor de secreție ai celulelor argentafine.

19.5.2.2 Cauzele sindromului carcinoid

Carcinoidul (inclus în grupa APUD-oamelor) se dezvoltă din celulele enterocromafine în tractul gastrointestinal (cel mai frecvent în ileon), pancreas, căi biliare. Tumorile argentafine sunt foarte rar localizate în alte regiuni, iar atunci este vorba despre un sistem de celule cu caracteristici histochimice şi răspândire heterogenă şi se presupune că fiecare substanță este sintetizată de un anumit tip de celulă. Celulele sistemului ADUD au rolul de a sintetiza amine şi peptide biogene. Astfel şi tumorile acestor celule vor sintetiza amine biogene. În carcinoid pot fi detectate aminele biogene dopamina şi noradrenalina. Însă produsul cel mai caracteristic al acestor tumori este serotonina (5-hidroxitriptamina). Sindromul carcinoid este de obicei asociat cu concentrații crescute în plasmă ale serotoninei.

Tumorile localizate la nivelul ileonului sau apendicelui produc tardiv sindromul clinic tipic, în momentul în care deja au metastazat, mai ales la nivelul ficatului. Produşii de secreție ai tumorilor intestinale sunt, de obicei inactivați la nivel hepatic, în timp ce produşii de secreție ai tumorilor dezvoltate în alte locuri, cum ar fi cele bronşice, sunt eliberate direct în circulația sistemică în forma activă, simptomatologia apărând mai repede. Este nevoie de triptofan 5-hidroxilaza, care transformă triptofanul în 5-hidroxitriptofan. Derepresia genei responsabile de sinteza acestei enzime în sindroamele maligne, conduce la sinteza exagerată de 5-hidroxitriptofan. Decarboxilaza şi mono-aminoxidazele sunt prezente în cantitate normală în țesuturile non-argentafine, astfel încât 5-hidroxitriptofanul se va acumula. Comparativ cu tumorile carcinoide adevărate, în sindroamele carcinoide asociate cu carcinoame bronşice, expresia urinară de 5-hidroxitriptofan şi 5-hidroxitriptamină este proporțional mai scazută decât a produsului de metabolism, acidul 5-hidroxiindolacetic.

19.5.2.3 Caracteristicile clinice ale sindromului carcinoid

Semnele şi simptomele cele mai frecvente sunt diareea, care poate fi suficient de severă pentru a cauza un sindrom de malabsorbție, dureri colicative, greață şi vomă, eritem facial, crize de bronhospasm, afecțiuni valvulare cardiace (stenoze pulmonare), respectiv leziuni fibrotice ale inimii drepte. Acestea nu apar atunci când tumora primară este la nivel bronşic. Alături de serotonină, celulele argentafine excretă de asemenea, un peptid numit *substanța P*, care în exces, poate cauza tahicardie, creşterea motilității intestinale şi hipotensiune. Simptomatologia din sindroamele carcinoide este mai probabil datorată prezenței substanței P, decât serotoninei. S-a sugerat că histamina ar fi la baza eritemului cutanat.

19.5.2.4 Diagnosticul sindromului carcinoid

Se bazează pe dozarea în urină a acidului 5-hidroxiindolacetic. Excreția zilnică a mai mult de 25 mg (125 μmoli) este element patognomonic, cu condiția ca pacientul respectiv să nu fi consumat banane, alune, produse care sunt foarte bogate în 5-hidroxiindol. Se restricționează aportul acestor substanțe cu 24 ore înaintea recoltarii urinei. De asemenea, administrarea paracetamolului poate cauza creşteri false ale acestei substanțe în urină, datorită interferenței cu determinarea chimică a acidului 5-hidroxiindolacetic.

19.5.3 Neoplaziile endocrine multiple (MEN) – sindroamele pluriglandulare

Sunt sindroame rare în care două sau mai multe glande produc cantități însemnate de hormoni. Există două grupe principale de sindroame:

- MEN I – include transformări maligne ale două sau mai multe dintre următoarele glande:
  - Glanda paratiroidă (adenoame);
  - Celule insulare pancreatice (gastrinoame, insulinoame);

- Hipofiza anterioară;
- Cortexul adrenal.

• MEN IIa– include:
- Carcinomul medularei tiroidiene;
- Feocromocitomul (tumori ale medularei suprarenale);
- Adenom sau carcinom paratiroidian;

• MEN IIb– include:
- Carcinomul medularei tiroidiene;
- Tumori ale medularei suprarenale;
- Adenom sau carcinom paratiroidian (rar);
- Variate anomalii somatice:
  - Sindrom marfanoid;
  - Neuromatoză mucoasă;
  - Pigmentare.

Ambele grupe de sindroame sunt de obicei familiale, transmise într-o manieră mendeliană dominantă.

19.6 Tumori non- endocrine producătoare de hormoni

Neoplaziile pot cauza anomalii în sinteza şi secreţia hormonilor, de aceea hormonii şi subunităţile lor pot fi folosiţi ca markeri tumorali. Sinteza anormală de hormoni poate fi clasificată după următoarele criterii: locul sintezei, cantitativ şi calitativ. După locul sintezei hormonii pot fi eutopici (sintetizaţi în ţesut endocrin) sau ectopici (sintetizati în ţesut non-endocrin). Astfel markerii neoplaziilor epiteliului endocrin sunt: PTH, calcitonina, gastrina, catecolaminele, glucagonul, insulina, gonadotropina corionică, ACTH, STH şi prolactina. Pe de alta parte, gonadotropina, ACTH şi calcitonina sunt sintetizaţi şi de ţesutul neoplazic al unor organe care în mod normal nu sintetizează hormoni (plamâni, pancreas, glanda mamară, stomac, sistem nervos). Din punct de vedere cantitativ, în neoplazii sinteza de hormoni poate să crească sau dimpotrivă, să scadă. De multe ori sinteza crescută de hormoni este însoţită de un „sindrom endocrin" caracteristic (ex.: sindrom Cushing, insulinom, glucagonom, gastrinom, feocromocitom etc.). Hormonii sintetizaţi pot avea o structură normală, dar pot fi şi precursorii unor hormoni sau hormoni cu o structură modificată, alterată. De obicei hormonii sintetizaţi în locurile ectopice au o structură heterogenă, câteodată complet diferită de structura hormonilor fiziologici.

Hormonii şi precursorii acestora pot fi detectaţi în cantităţi mici (cu ajutorul tehnicilor imunochimice ultrasensibile) în multe organe şi ţesuturi care, în mod normal, nu sunt considerate a fi ţesuturi endocrine. Când în acestea se dezvoltă tumori, cantităţi crescute de hormoni vor fi sintetizate şi eliberate în circulaţie, producându-se sindroame care adesea sunt recunoscute ca fiind datorate producţiei ectopice de hormoni. Datorită faptului că producerea ectopică de hormoni sau substanţe similare hormonale nu este supusă controlului normal de feed back, aceasta este cel mai adesea excesivă. Multe tumori ale ţesuturilor non-endocrine secretă substanţe hormonale foarte asemănătoare unor hormoni naturali, adesea identice cu acestea. Unele dintre aceste tumori s-au dovedit a secreta doi sau chiar mai mulţi hormoni.

19.6.1 Hormonii eutopici

În acest grup sunt incluse tumorile endocrine care secretă proprii hormoni într-o cantitate crescută. Aceste neoplazii pot fi identificate şi monitorizate prin dozarea hormonului respectiv. Sensibilitatea poate fi crescută cu folosirea testelor de stimulare care cresc secreţia hormonilor *(Tabelul 19.XIX)*.

19.6.2 Hormoni ectopici – Mecanismul producerii ectopice de hormoni

S-au propus mai multe teorii care să explice secreţia ectopică hormonală. Hormonii ectopici sunt aproape întotdeauna peptide sau proteine. Teoretic, cel puţin, fiecare celulă are capacitatea de a produce orice peptid sau proteină codificată în codul său genetic din acizii nucleici cromozomiali. Hormonii ectopici sau alte peptide pot fi produse de celulele maligne dacă acestea s-au întors la statusul pluripotent embrionar iniţial. Aceasta poate cauza modificări histologice asociate cu neoplazia, uneori asociate cu sinteza semnificativă de peptide nedetectabile în mod normal în ţesuturile diferenţiate.

În ultimii ani s-a descoperit faptul ca sinteza de hormoni peptidici este o trăsătură comună a celulelor canceroase. Cele mai multe studii se referă la cancerul bronşic: 10% din pacienţii cu această boală prezintă sinteză ectopică de hormoni.

Tumorile celulelor APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*) - "APUD-oamele" au o activitate intensă de sinteză hormonală. Aceste tumori sunt: cancerul bronşic cu celule mici, carcinoidul, carcinomul celulelor Langerhans (insulinomul). Aceste tumori sintetizează în primul rând ACTH, care duce la apariţia unui sindrom de hiperproducţie ectopică a acestui

Tabelul 19.XIX. Tumori producătoare de hormoni eutopici şi efectele acestora

Tumori	Hormoni	Efecte
Tumorile medulosuprarenalei Feocromocitom Neuroblastom	Adrenalina	Excreţie urinară crescută de catecolamine şi metaboliţi
Tumorile corticosuprarenalei	Aldosteron Cortizol	Sindrom Conn diselectrolitemie
Tumorile hipofizare	Prolactina STH	Sindrom Cushing Excreţie crescută de 17-CS
Pancreas - tumorile celulelor Langerhans (insulinom)	Insulina	Glicemie oscilantă
Pancreas – gastrinom	Gastrina	
Paratiroide – adenoame	PTH	Calciu seric fluctuant
Carcinom tiroidian medular	Calcitonina	
Choriocarcinom	HCG	

hormon. Pe lângă ACTH, aceste tumori mai sintetizează şi alţi hormoni ectopici. Astfel cancerul bronşic cu celule mici sintetizează paralel cu sinteza de ACTH şi lipotrofină (LPH) şi mari cantităţi de calcitonină. Sinteza de gastrină şi HCG este mai rară (*Tabelul 19.XX*).

În contrast cu APUD-oamele, carcinomul epidermoid şi adenocarcinomul pulmonar nu sintetizează ACTH, LPH sau ADH decât foarte rar; sunt mai frecvent sintetizate în schimb calcitonina, HCG şi STH.

Carcinomul mamar poate fi inclus în grupul non-APUD-oamelor pentru că sinteza hormonilor de tip APUD este foarte rară: sunt sintetizaţi mai ales hormoni şi peptide placentare (HCG, HPL- Human Placental Lactogen).

Gonadotropina corionică umană (hCG)

Este un hormon produs în mod normal de către trofoblaştii placentari şi atinge concentraţii maxime în plasma femeii însărcinate în săptămâna a 8-a de sarcină. Este format din 244 de aminoacizi şi are o masă moleculară de 36,7 kDa.

Molecula de hCG este compusă din două subunităţi – α şi β. Subunitatea α este identică cu cea a hormonului luteinizant (LH), a hormonului foliculostimulant (FSH) şi a hormonului tireotrop (TSH). Subunitatea β este specifică hCG. Din acest motiv este preferată dozarea acesteia atunci când se analizează acest hormon. Prezenţa hCG în plasmă în afara sarcinii indică prezenţa ţesutului trofoblastic anormal sau o tumoră secretantă de hormoni ectopici. βhCG este un marker tumoral cvasi-ideal pentru coriocarcinom (o proliferare malignă a vilozităţilor corionice ce se poate dezvolta din mola hidatiformă), dar poate fi folosit şi pentru alte tumori cu celule germinale ale testiculului şi ovarului. Mola hidatiformă se tratează prin chiuretaj uterin, însă dacă îndepărtarea este incompletă pacietele prezintă risc de dezvoltare a unui coriocarcinom. βhCG este un marker tumoral extrem de sensibil detectând tumori cu greutate de doar 1 mg (aproximativ 10^5 celule). Toate pacientele care au fost diagnosticate cu molă hidatiformă trebuie urmărite prin determi-

Tabelul 19.XX. Tumori producătoare de hormoni ectopici

TUMORI	HORMONI
APUD-oame	
Cancer bronşic cu celule mici Carcinoid Tumorile celulelor insulare (pancreas)	ACTH Lipotrofina (LPH) Vasopresina (ADH) Calcitonina, PTH, gastrina, (insulina, glucagon)
Non APUD-oame	
Plamâni- carcinom epidermoid şi adenocarcinom	Calcitonina, PTH, STH, prolactina, insulina, glucagon
Cancer mamar	HCG, HPL, calcitonina, PTH, ACTH

nări periodice ale concentraţiilor plasmatice ale βhCG. Dacă tumora se dezvoltă, acest marker poate fi folosit ca un indicator al răspunsului terapeutic. hCG este secretat şi de aproximativ 50% din teratoamele testiculare şi trebuie determinat împreună cu α-fetoproteina atunci când se face urmărirea pacienţilor după terapia antitumorală. Deoarece concentraţia plasmatică a LH creşte după orhiectomie este important să folosim o metodă care determină lanţul β al hCG pentru a evita reacţiile încrucişate care ar putea indica o creştere aparentă a hCG.

Valori normale:

- la bărbaţi şi la femei < 5 U/L
- la femei în menopauză < 10 U/L.

Valori crescute: tumorile maligne ale celulelor germinale, seminoame, coriocarcinom, molă hidatiformă, în sarcina multiplă şi rareori în adenocarcinomul gastric şi pancreatic.

Structura hormonilor ectopici diferă des de structura hormonilor fiziologici. Diferenţele apar mai puţin în secvenţa primară a aminoacizilor, cât mai ales post-translaţional, în forma precursorilor, subunităţilor. Astfel hormonii ectopici formează un grup heterogen în care predomină formele cu greutatea moleculară mai mare. Astfel de modificări caracterizează mai ales sinteza ectopică de ACTH.

Spre deosebire de hormonii secretaţi prin hiperactivarea patologică a glandelor endocrine, hormonii produşi în situsurile ectopice nu se găsesc sub controlul de feedback negativ normal şi sunt secretaţi în mod continuu. Producerea ectopică de substanţe asemănătoare hormonilor este evidentă clinic dacă acestea au şi efecte hormonale.

19.6.3 Sindroamele hormonale

Unul dintre cele mai frecvente sindroame de acest fel este ***hipercalcemia*** datorată secreţiei excesive de PTH RP (parathormon-related-protein). Aceasta este asociată cu mai multe tipuri de afecţiuni maligne, incluzând carcinomul bronşic cu celule scuamoase. PTH RP conţine cei 34 de aminoacizi aminoterminali ai hormonului paratiroidian, asfel încât are o acţiune similară acestuia asupra osului. Instalarea hipercalcemiei poate fi foarte rapidă în contrast cu aceea din hiperparatiroidismul primar.

Hiponatremia *datorată secreţiei de hormon antidiuretic (ADH)*

Producerea ectopică de ADH este cel mai adesea asociată cu o formă relativ rară de carcinom bronşic - cel cu celule în bob de ovăz. Scăderea graduală a osmolarităţii plasmatice permite restabilirea echilibrului osmotic de o parte şi de alta a membranelor celulare, astfel încât pacienţii pot să nu prezinte simptomele clinice ale hipoosmolarităţii. Nu este nevoie de tratament, cu excepţia restricţionării administrării de lichide; dacă osmolaritatea plasmatică scade suficient de rapid pentru a cauza o simptomatologie de tip edem cerebral, poate fi necesar un tratament mult mai intensiv. Perfuzarea de cantităţi mici de fluide hiperosmolare, concomitent cu administrarea unui diuretic va creşte osmolaritatea plasmatică fără expansionarea volumului plasmatic.

Hipopotasemia *consecutivă producerii excesive de hormon adrenocorticotrop (ACTH)*

Secreţia ectopică de ACTH stimulează secreţia tuturor hormonilor adrenocorticali. Forma clinică este similară cu aceea a hiperaldosteronismului primar. Cel mai adesea, producerea ectopică de ACTH se realizează de către celulele carcinomului bronşic cu celule mici, dar a fost descris de asemenea frecvent în asociere cu alte leziuni maligne, în special cu tumorile carcinoide pulmonare. Pacienţii prezintă hipokaliemie severă asociată cu alcaloză. Administrarea compensatorie de potasiu este eficientă doar dacă se administrează concomitent spironolactonă, amilorid sau triamteren.

Policitemia consecutivă unei secreţii excesive de eritropoetină sau a unor molecule eritropoetin-like este bine cunoscută ca şi complicaţie a carcinoamelor renale. Eritropoetina stimulează eritropoeza medulară. Datorită faptului că este vorba de o secreţie inadecvată a unui hormon de origine renală, nu putem vorbi aici de o secreţie ectopică de hormon. Oricum acest sindrom a fost raportat în asociaţie cu alte tumori, în special de natură hepatocelulară, de exemplu hepatomul primar.

Hipoglicemia datorată producerii excesive de insulină sau de insulin-like growth factor (IGF) este de asemenea rară, şi a fost de asemenea raportată în asociere cu multe alte tumori, cum ar fi de exemplu carcinoamele hepatocelulare sau tumorile mezenchimale retroperitoneale sau toracice.

Ginecomastia datorată secreţiei de gonadotropină corionică umană (HCG) a fost asociată frecvent cu diverse tumori, cum ar fi carcinoamele bronşice, carcinoamele de sân sau ficat, datorită creşterii concentraţiei serice a acestui hormon. Sindromul este rareori întâlnit.

Hipertiroidismul datorat secreţiei excesive de hormon tireostimulant (TSH). Unele tumori cu celule trofoblastice cum ar fi coriocarcinoamele şi teratoamele testiculare s-au dovedit a fi secretoare de substanţe TSH-like. Hipertiroidismul clinic este extrem de rar, chiar şi atunci când concentraţia plasmatică a hormonului este ridicată.

19.7 Enzime şi izoenzime

Celulele canceroase au o activitate enzimatică diferită atât cantitativ, cât şi calitativ. Folosirea enzimelor ca markeri tumorali este unul dintre primele evenimente din istoria biochimiei (Warburg – experimentele de glicoliză anaerobă pe celule canceroase). Cauzele creşterii în ser a activităţii enzimatice a unor enzime care provin din ţesutul neoplazic sunt:

- necroza
- tulburări de permeabilitate
- alterări ale celulelor sau membranelor, cauzate de terapie.

În plus, enzimele pot fi eliberate şi de ţesuturile normale din organism, ca urmare a alterărilor provocate de procesul tumoral.

Enzimele folosite în general în biochimia clinică (LDH, amilaza, CK, γ-GT, etc.), nu sunt utile pentru diagnosticul primar al tumorilor, dar sunt utilizate pentru monitorizarea terapiei şi evoluţiei bolii, ca markeri de linia a doua. Câteva enzime şi izoenzime pot fi folosite însă şi ca markeri tumorali de primă linie (fosfataza acidă). Aceste enzime au specificitate de localizare a tumorii (specificitate de organ).

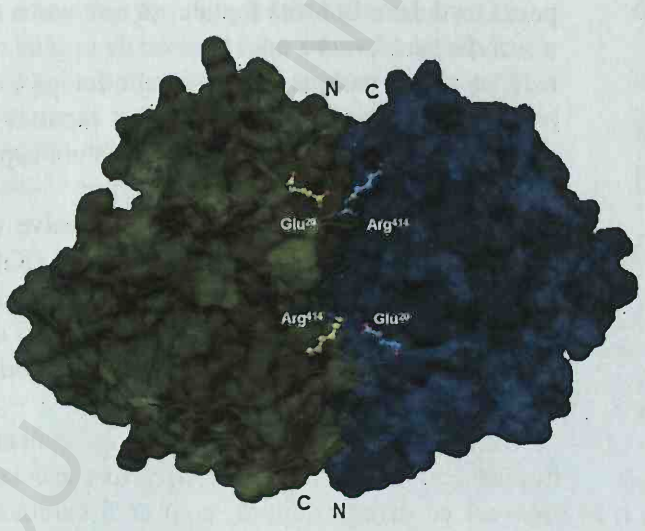


Figura 19.4. Enolaza neuron specifică – structură reprezentată cu ajutorul UCSF Chimera (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Enolase_with_differentiated_subunits.jpg).

19.7.1 Fosfataza acidă prostatică -PAP

Este o enzimă secretată de prostată. În trecut era folosită pentru monitorizarea cancerelor prostatice deoarece la aceşti pacienţi are concentraţii serice mult mai mari. Ulterior a fost înlocuită de PSA.

Valoarea testului PAP, indiferent de nivel, nu trebuie interpretată ca fiind dovadă pentru prezenţa sau absenţa bolii maligne. Hiperplazia benignă de prostată, masajul prostatic şi infarctul de prostată pot avea ca şi consecinţă creşterea concentraţiei de PAP.

Studii recente sugerează că PAP ar avea un rol important în stabilirea prognosticului la pacienţii cu cancer prostatic care au beneficiat doar de tratament local. Evaluarea corectă a acestor bolnavi este necesară deoarece astăzi se urmăreşte selectarea cât mai exactă a pacienţilor cu beneficii reale în urma unei terapii sistemice. În acest context, rolul PAP urmează să fie reconsiderat.

Valori normale: 0,0 – 3,5 ng/mL

Această enzimă se pare că are un rol şi în transmiterea sexuală a virusului imuno-deficienţei umane (HIV). S-a observat că fragmentele PAP formează fibrile amiloidice. Aceste fibrile (denumite "amplificatori spermatici ai infecţiei virale" – *Semen-derived Enhancer of Virus Infection*) captează virionii HIV şi promovează ataşarea lor la celulele ţintă, amplificând astfel potenţialul infecţios al virusului HIV. Acest efect al PAP poate reprezenta o nouă ţintă pentru prevenirea transmiterii infecţiei HIV pe cale sexuală.

19.7.2 Enolaza neuron specifică- NSE

Este o enzimă citoplasmatică cu masa moleculară de 82-100 kDa şi are rol în metabolizarea intracelulară a glucozei (catalizează transformarea 2-fosfogliceratului în fosfoenolpiruvat). Enolaza neuron-specifică este una din cele cinci izoenzime ale enolazei. Enolaza are trei tipuri de subunităţi: α (46 kDa), β (44 kDa) şi γ (46 kDa) codificate de gene diferite. Aceste subunităţi se combină câte două şi formează cinci izoenzime: γγ, αα, ββ, αβ şi αγ. Izoenzimele homodimerice sunt mai frecvent întâlnite decât celelalte forme *(Figura 19.4)*.

- Izoenzima αα (enolaza non-neuronală - NNE, enolaza 1) se găseşte în ficat, creier, rinichi, splină, tesutul adipos.

Tabelul 19.XXI. Sensibilitatea NSE în diagnosticul tumorilor însoţite de diferenţiere neuro-endocrină

Tumori	Sensibilitate (%)
Neuroblastom	97
Carcinom pulmonar cu celule mici	83
APUD-oame	74

- Izoenzima ββ (enolaza muşchi-specifică - MSE, enolaza 3) se găseşte în principal în cord şi musculatura scheletică.
- Izoenzima γγ (enolaza neuron-specifică – NSE, enolaza 2 - ENO2) se găseşte în cantităţi crescute în neuroni şi celule neuro-endocrine precum şi în tumorile însoţite de diferenţiere neuroendocrină (neuroblastom, carcinom pulmonar cu celule mici) *(Tabelul 19.XXI)*. La pacienţii cu acest tip de tumori se secretă în sânge o cantitate însemnată de NSE ca rezultat al distrugerii tisulare intense.

Cea mai importantă indicaţie a NSE este monitorizarea evoluţiei şi terapiei pacienţilor cu tumori neuro-endocrine, în special cancerul pulmonar cu celule mici (*Tabelul 19.XXII*) şi neuroblastomul. Indică foarte precis eficacitatea chimioterapiei – dacă după 48 ore de terapie nu se observă o creştere semnificativă în activitatea NSE, atunci tumora este rezistentă la tratament.

Valori normale: 0 – 13 ng/mL.

În 60-81% din cazurile de cancer pulmonar cu celule mici se întâlnesc concentraţii crescute ale NSE. Valorile NSE se corelează cu gradul de extensie a bolii. Nivelurile persistent crescute de NSE sugerează lipsa răspunsului la chimioterapie. La 80-96% din pacienţii aflaţi în remisie, NSE are valori normale.

La 62% din pacienţii cu neuroblastom se întâlnesc niveluri crescute ale NSE care se corelează cu stadiul clinic al bolii.

NSE poate creşte şi în afecţiuni benigne cerebrale sau pulmonare.

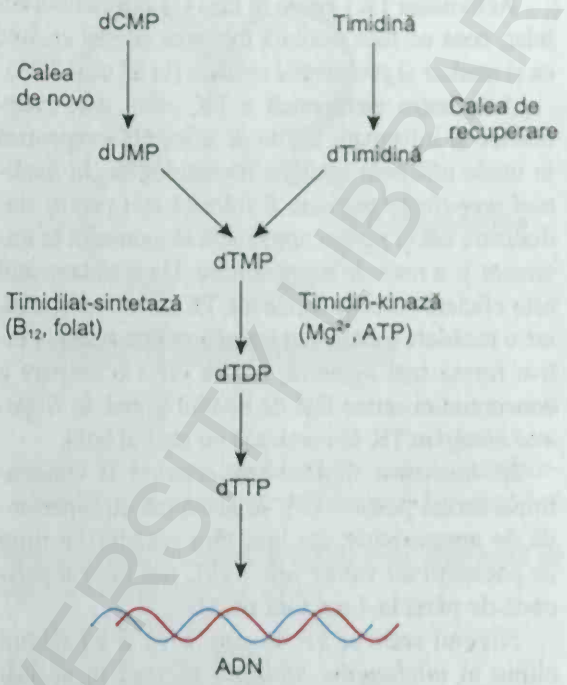


Figura 19.5. Calea de novo şi calea de recuperare în sinteza ADN

19.7.3 Timidin-kinaza (TK)

Timidin-kinaza (dezoxitimidin kinaza) este o enzimă citosolică implicată în sinteza ADN. Sinteza ADN se poate face pe două căi:

- calea *de novo*
- calea de recuperare (în care nucleotidele sunt sintetizate din produşii de degradare ai ARN şi ADN; este o cale de sinteză importantă deoarece unele ţesuturi nu posedă capacitatea de a sintetiza ADN pe calea *de novo*)

Valori normale: 0-5 U/L.

În cadrul căii de recuperare, TK catalizează conversia dezoxitimidinei la dezoxitimidin-monofosfat, care apoi intră pe calea comună de sinteză a ADN (*Figura 19.5*).

Celulele umane conţin două izoenzime ale TK: TK1 - citosolică (se asociază cu proliferarea celulară) şi TK2 - mitocondrială (este necesară în sinteza mitocondrială a ADN).

Tabelul 19. XXII. Sensibilitatea markerilor NSE – CEA în cancerul pulmonar

Tipul bolii	N	NSE	CEA
Carcinom cu celule mici	81	37,8 +/- 41,5 (74%)	12,2 +/- 16,2 (47%)
Alte carcinoame	108	9,4 +/- 3,5 (15%)	10,7 +/- 14,5 (46%)
Boli pulmonare benigne	79	7,2 +/- 2,0 (5,1%)	3,4 +/- 3,2 (13,9%)
Persoane sănătoase	92	7,1 +/- 2,0 (0%)	1,8 +/- 0,8 (0%)

BCU IAŞI - BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

Activitatea TK1 creşte în faza G1/S a ciclului celular, ceea ce face posibilă folosirea acestei enzime ca şi marker al proliferării celulare (la fel ca şi TPA).

Activitatea enzimatică a TK oferă date prognostice şi informaţii legate de eficienţa terapeutică în unele afecţiuni maligne hematologice. În *limfomul non-Hodgkin* poate fi folosită atât pentru stadializare cât şi pentru aprecierea răspunsului la tratament şi a ratei de supravieţuire. Dacă tratamentul este eficient valorile serice ale TK se normalizează, iar o recădere a bolii sau transformarea acesteia într-o formă mai agresivă, are ca efect o creştere a concentraţiei serice faţă de nivelul iniţial. În *limfomul Hodgkin* TK se corelează cu stadiul bolii.

În *leucemia limfocitară cronică* o concentraţie serică peste 7 U/L se asociază cu o perioadă de aproximativ opt luni fără recăderi în timp ce pacienţii cu valori sub 7 U/L pot avea o perioadă de până la 4 ani fără recăderi.

Nivelul seric al TK se corelează şi cu stadiul clinic al *mielomului multiplu* oferind în acelaşi timp date prognostice referitoare la supravieţuire. Mai mult, TK poate fi folosită pentru diferenţierea mielomului multiplu de gamapatiile monoclonale de cauză nedeterminată.

Determinarea nivelului de TK poate identifica precoce recurenţele leucemiei mieloide şi limfocitare acute, înainte ca acestea să poată fi observate microscopic. Există o legătură strânsă între nivelul TK, numărul leucocitelor, procentul de blaşti în sânge, răspunsul terapeutic şi perioada de supravieţuire după stabilirea diagnosticului. Aşadar, TK este un indicator al agresivităţii celulelor leucemice, oferind date despre răspunsul terapeutic şi perioada de supravieţuire.

Un nivel ridicat de TK poate anticipa transformarea unui sindrom mielodisplazic în leucemie mieloidă acută.

TK mai poate fi folosită ca marker tumoral şi în: tumori cerebrale, carcinom pulmonar cu celule mici, cancer mamar. De asemeni creşte şi în câteva boli virale (virus herpetic, citomegalic, HIV) şi poate fi folosită şi pentru monitorizarea acestor boli.

19.8 Proteine serice speciale

19.8.1 Feritina

Este o proteină globulară care stochează şi eliberează fierul într-o manieră controlată. Feritina necombinată cu fier se numeşte *apoferitină* şi are o greutate moleculară de 450 kD. Aceasta prezintă o cavitate centrală (unde este depozitat fierul) şi un înveliş proteic (cu rolul de a proteja celula de efectele toxice ale ionilor de fier) format din 24 de molecule de două tipuri: H (*heavy,* 21 kD) şi L (*light,* 19 kD). O singură moleculă de apoferitină poate lega între 1500 şi 4500 de ioni de fier, greutatea moleculară a feritinei depăşind în acest caz 800 de kDa. Sinteza apoferitinei este stimulată de expunerea la fier.

Există cel puţin 20 de proteine distincte (izoferitine) cu proporţii variabile de lanţuri H şi L. În funcţie de încărcătura de suprafaţă acestea se clasifică în:

- *izoferitinele acide,* conţin o proporţie crescută de lanţuri H şi predomină în rinichi, placentă, miocard, limfocite, monocite, precursorii eritrocitelor şi în ţesuturile tumorale.
- *Izoferitinele bazice,* sunt mai bogate în lanţuri L şi se găsesc în ficat, splină şi în ser.
- Feritina bogată în lanţuri L este mai stabilă şi are funcţia de a stoca fierul pe termen lung în timp ce moleculele bogate în lanţuri H au un rol mai activ în metabolismul fierului.

În ţesuturile tumorale se găsesc mai ales izoferitine acide. În caz de exces de fier, ţesuturile tumorale sintetizează subunităţi H. Creşterea cantităţii de feritină în celulele canceroase se poate explica pe de o parte prin alterarea metabolismului fierului în organismul bolnavului, iar pe de altă parte, prin secreţia feritinei de către celulele neoplazice.

Valori normale:

- Bărbaţi: 18-440 ng/mL
- Femei: înainte de menopauză: 8-120 ng/mL, după menopauză: 30-300 ng/mL
- Nou-născut < 600 ng/mL

Valori crescute: inflamaţii, tumori, talasemie, sideroblastoză, hemocromatoză, hepatopatii;

Valori scăzute: sideropenie, sindrom nefrotic, sindrom malabsorbtiv, graviditate.

În următoarele neoplazii feritina creşte în 40-70% din cazuri:

- leucemia acută;
- limfom Hodgkin;
- carcinom pulmonar;
- carcinom de colon;
- carcinom hepatic;
- carcinom de prostată.

Se pare că feritina prezintă o mare afinitate pentru *high molecular weight kininogen* (HMWK) şi formele clivate ale acestuia, care sunt inhibitori endogeni ai angiogenezei; cHMWK rezultă în urma clivării kininogenului

cu greutate moleculară mare pe celulele endoteliale. După legarea feritinei la cHMWK se produce inhibarea efectului antiangiogenic pe care cHMWK îl are în mod normal rezultând un efect pro-angiogenetic. Prin antagonizarea efectului antiangiogenic al cHMWK feritina permite bradikininei şi altor compuşi proangiogenici să aibă un efect predominant. Nivelul crescut al feritinei în cazul inflamaţiilor şi al afecţiunilor maligne poate avea un rol în reglarea angiogenezei [9].

19.8.2 Tireoglobulina

Este o glicoproteină dimerică de 660 kD produsă de celulele foliculare ale tiroidei şi folosită pentru sinteza de hormoni tiroidieni (tiroxina şi triiodotironina). Funcţia acestei glicoproteine este aceea de a transporta hormonul tiroidian în timpul sintezei şi acumulării acestuia în tiroidă.

Tireoglobulina creşte la majoritatea bolnavilor cu carcinom tiroidian, de aceea această proteină este folosită ca marker al cancerului tiroidian. Cea mai mare sensibilitate diagnostică o are în tumorile tiroidiene diferenţiate (>90%). Nu există date suficiente despre sensibilitatea şi specificitatea tireoglobulinei în tumorile nediferenţiate. Nu există nici o corelaţie între valorile tireoglobulinei şi carcinomul medular tiroidian. Concentraţia tireoglobulinei creşte şi în alte boli tiroidiene: tiroidite, noduli tiroidieni benigni. Tireoglobulina este importantă mai ales în monitorizarea evoluţiei cancerului tiroidian: este folosită în asociere cu scintigrafia sau o poate chiar înlocui.

Valori normale: 3-60 ng/mL

Valori peste 500 ng/mL sunt observate în metastaze osoase sau pulmonare.

Împotriva tireoglobulinei se pot forma autoanticorpi. Aceştia pot modifica rezultatul analizelor şi de aceea uneori se impune determinarea concomitentă şi a autoanticorpilor.

Determinarea în sânge a ARNm folosit în sinteza tireoglobulinei este o metodă mai nouă, iar rezultatele nu sunt influenţate de prezenţa autoanticorpilor.

19.8.3 Beta-2-microglobulina (β2-mg)

Este o proteină cu o masa moleculară de 11,8 kD. Este alcătuită din 100 de aminoacizi. Această proteină este identică cu lanţul uşor al antigenului de histocompatibilitate leucocitară HLA clasa I *(Figura 19.6)*. Se găseşte pe membranele tuturor celulelor diferenţiate. Este prezentă în lichidele biologice în concentraţie scăzută (ser, urină, salivă, lichid cefalorahidian etc) sub două

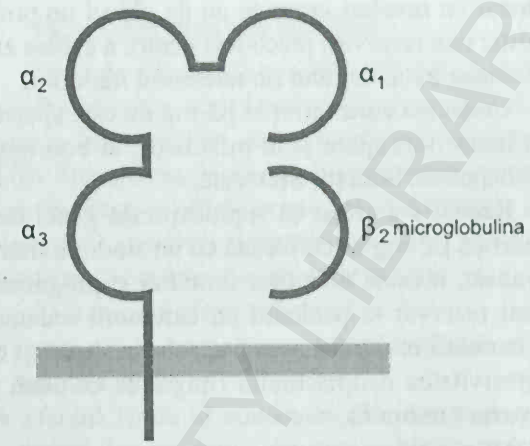


Figura 19.6. Reprezentarea schematică a complexului major de histocompatibilitate (HLA clasa I-a)

forme: liberă şi legată de HLA. Este eliminată de rinichi în proporţie de 98%.

Valori normale:

- ser: 1,2-2,5 mg/L
- urină: 0,02-0,3 mg/L (pH-ul acid < 6 o distruge);
- LCR: 0,8-1,8 mg/L

Timp de înjumătăţire: 40 minute.

Cauzele creşterii beta-2-microglobulinemiei:

- sinteza crescută;
- distrugerea celulelor / turnover crescut în celulele sistemului imun;
- scăderea ratei filtrării glomerulare.

În cazul tumorilor, concentraţia β2-mg creşte datorită sintezei crescute în ţesutul tumoral, dar poate creşte şi datorită inflamaţiei sau alterărilor suferite de ţesuturile din jurul tumorii (*Tabel 19.XXIII).*

Nivelurile sanguine ale β2-mg cresc în mielom multiplu, leucemie limfocitară cronică şi unele limfoame. Poate fi folosit pentru aprecierea prognosticului pe termen lung în aceste afecţiuni (pa-

Tabelul 19.XXIII. Sensibilitatea β2- mg în diagnosticul diverselor tumori

Tumori	Sensibilitate
Pulmonar	42 %
Mamar	40 %
Colo-rectal	52 %
Gastric	57 %
Pancreatic	75 %
De col uterin	57 %
Limfom Hodgkin	48 %
Limfom nonHodgkin	62 %
LLC	69 %

cienţii cu niveluri crescute au de obicei un prognostic mai rezervat) precum şi pentru a evalua eficacitatea tratamentului (în mielomul multiplu).

Creşterea concentraţiei β2-mg nu este specifică tumorilor; apare şi în inflamaţii, în boli renale, hepatice, infecţii, SIDA etc.

Recent s-a arătat că supraexpresia genei care codifică β2-mg se corelează cu un stadiu tumoral avansat, invazia nodulilor limfatici şi prognostic vital rezervat la pacienţii cu carcinom scuamos al cavităţii orale. De asemenea se corelează şi cu agresivitatea neoplasmului (migrarea celulară şi invazia tumorală).

19.8.4 Proteina S-100

Este o proteină astroglială cu o masă moleculară de 21 kD, cu capacitatea de a lega calciul. Numele său derivă din faptul că această proteină este solubilă în proporţie de 100% în sulfat de amoniu la pH neutru. Este alcătuită din 2 subunităţi (α, β) care se cuplează în forme homo- şi heterodimere.

S-100 are o serie de funcţii intra- şi extracelulare cum ar fi: reglarea fosforilării proteinelor, a factorilor de transcripţie şi în homeostazia Ca^{2+}. De asemenea este implicată în dinamica constituenţilor citoscheletului, unele activităţi enzimatice, creştere şi diferenţiere celulară şi în răspunsul inflamator.

Este prezentă în:

- celule gliale şi celule Schwann (ββ);
- celule gliale (αβ);
- muşchi striaţi, rinichi şi miocard (αα);

Testul S-100 măsoară izoformele ββ şi αβ în ser şi LCR.

Valori normale: < 0,3 μg/L

Proteina S-100 detectează cu o mare sensibilitate bolile sistemului nervos central. Constituie un parametru util de monitorizare a pacienţilor cu AVC. Valorile S-100 se corelează semnificativ cu severitatea deficitului neurologic şi cu mărimea zonei de infarct cerebral. În traumatismele cerebrale se corelează cu severitatea leziunii. Ca marker tumoral este folosită în:

- tumori primare şi metastaze (neurinom, glioblastom, astrocitom, meningiom);
- monitorizarea melanomului malign.

Nivelul S-100 se corelează exact cu stadiul clinic al melanomului malign şi este folosit ca factor de prognostic (*Tabelul 19. XXIV*). Totuşi acest marker nu trebuie utilizat ca test de screening sau diagnostic pentru melanomul malign.

S-100 este folosită şi pentru monitorizarea terapiei melanomului şi pentru detectarea recăderilor tumorale.

Tabelul 19.XXIV. Valoarea prognostică a S-100

Concentraţia S-100 (μg/L)	Supravieţuire la 3 ani (%)
< 0,3	85%
0,3-0,6	50%
> 0,6	10%

Recent s-a observat o asociere strânsă a acestei proteine cu cardiomiopatia şi unele boli neurodegenerative.

19.9 Determinarea markerilor tumorali

19.9.1 Recoltarea si stocarea

Recoltarea şi stocarea corectă a materialelor biologice este esenţială pentru ca rezultatele analizelor să fie corecte.

Recoltarea:

- Se face dimineaţa pe nemâncate.
- Sângele se recoltează ca atare, fără aditivi.
- Se recoltează 10 ml de sânge din venele cubitale. Trebuie evitată aplicarea prelungită a garoului înainte de recoltarea sângelui.
- Sângele poate fi stocat la temperatura camerei maxim 1-2 ore.

Stocarea:

- Sângele coagulat trebuie centrifugat şi serul trebuie transferat în 2-3 criotuburi, care pot fi închise. În ser nu trebuie să rămână hematii.
- Aceste probe pot fi stocate la 4°C 4-5 zile sau la temperatura de –20°C, pentru câteva săptămâni.
- Pentru determinarea markerilor tumorali probele sunt decongelate la temperatura camerei (1-2 h) şi omogenizate. Proba odată decongelată nu mai poate fi recongelată. După decongelare proba poate fi stocată 4-5 zile la temperatura de 4°C.

Important!

Analizele nu pot fi făcute din probe biologice cu hemoliză şi/sau lipemie.

19.9.2 Metode de analiză

Metodele utilizate pentru determinarea markerilor tumorali trebuie să îndeplinească următoarele cerinţe:

- Specificitate;
- Sensibilitate;
- acurateţe, reproductibilitate;
- variaţia în timpul determinării: < 5%;
- variaţia între determinări: < 10%.

Tabelul 19.XXV. Limitele de detecţie ale diverselor metode imunologice

Metoda	Limita detecţiei (fmol/L)
EIA	1-0,1
FIA	0,01
LIA	0,01-0,00001

Determinarea de rutină a markerilor tumorali este făcută cu metode imunochimice şi cromatografice. Principiul acestor metode: reacţia antigen-anticorp. Specificitatea este asigurată de anticorpii folosiţi. Sunt folosiţi anticorpii monoclonali care au o serie de avantaje:

- specificitate de antigen;
- nu apare imunoabsorbţie;
- sunt standardizaţi;
- interval de măsurare larg.

Metodele moderne de imunochimie pot fi automatizate. De obicei anticorpul este legat în faza solidă. Aici se formeaza complexele imune, iar excesul de reactivi este îndepărtat prin spălare.

Tehnici de marcare: Cantitatea de complexe imune poate fi determinată dacă anticorpul sau antigenul din complex se marchează cu o substanţă care emite un semnal care apoi este măsurat.

Substanţa cu care se marchează anticorpul trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

- să emită un semnal stabil, uşor de măsurat;
- să lege atât moleculele mici, cât şi pe cele mari;
- să nu modifice în nici un fel legătura antigen-anticorp.

Substanţele folosite pentru marcare:

a. *metode radioimunochimice (RIA)* - folosesc izotopii radioactivi (^{125}I). Intensitatea radioactivităţii este proporţională cu concentraţia substanţei cercetate.

Avantajul metodei: sensibilitatea crescută;

Dezavantajele metodei:

- timp de expirare scurt al reactivilor;
- costuri ridicate;
- nu poate fi automatizată;
- dezavantajele radioactivităţii.

b. *metode imunochimice* – care nu folosesc izotopii ca markeri

Folosesc:

- enzime – EIA (enzymatic imunoassay);
- substanţe fluorescente – FIA (fluorescent imunoassay);
- substanţe luminescente – LIA (luminescent imunoassay).

19.9.3 Asigurarea calităţii

Depinde de metoda analitică folosită şi de activitatea laboratorului. Deci asigurarea calităţii cuprinde faza analitică, dar şi fazele pre- şi postanalitice (recoltarea, stocarea, înregistrarea probelor, interpretarea rezultatelor etc.). Laboratoarele care determină markerii tumorali trebuie să efectueze controalele interne şi externe de calitate.

Factori care afectează rezultatele:

- erori privind recoltarea, transportul sau stocarea probelor;
- efectul Hook al concentraţiilor mari: în cazul metodelor moderne de imunochimie apare la concentraţii de peste 50000 U/mL;
- efectul anticorpilor heterofili poate să apară în următoarele cazuri: muşcătura de şobolani sau alte animale (ex.: la îngrijitorii de animale) sau la bolnavii care au făcut terapii imune.

19.9.4 Criterii de alegere şi validare

Sensibilitatea unei metode este calitatea acesteia de a pune în evidenţă chiar şi cantităţi foarte mici din substanţa de analizat (''de a nu da rezultate fals negative''- **FN**).

Specificitatea unei metode de analiză este capacitatea acesteia de a evidenţia (semnala) doar parametrul de analizat („de a nu da rezultate fals pozitive" - **FP** - sau „de a da un rezultat real negativ - **RN** - dacă parametrul nu se găseşte în proba de analizat") *(Figura 19.7).*

Tabelul de contingenţă al acestor doi parametri este redat în *Figura 19.8.*

Pentru aprecierea cantitativă a performanţei unei metode diagnostice este necesară explicarea şi calcularea parametrilor:

- sensibilitatea (**Se**) unui test diagnostic - este probabilitatea ca un individ bolnav să aibă rezultatele testului pozitive:

  Se=[RP/(RP+FN)]x100

  sau

$$Se = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori anormale ale markerilor tumorali}}{\text{nr. total al cazurilor de cancer}} \times 100$$

  Depinde de stadiul bolii şi de valoarea „cut off".

- specificitatea (**Sp**) unui test diagnostic - este probabilitatea ca un individ fără boala respectivă să aibă rezultatele testului negative:

  Sp=[RN/(RN+FP)]x100

  sau

$$Sp = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori normale ale markerilor tumorali}}{\text{nr. total cazuri fără cancer}} \times 100$$

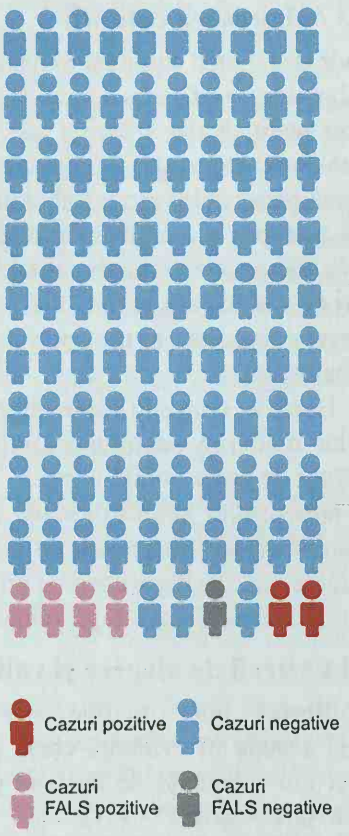


Figura 19.7. Valoarea markerilor tumorali în screening-ul cancerului

- rata fals negativă (**RFN**) - este probabilitatea ca un individ bolnav să aibă rezultatele testului negative:

  RFN=[FN/(FN+RP)]x100;

- rata fals pozitivă (**RFP**) - este probabilitatea ca un individ fără boala respectivă să prezinte rezultate pozitive ale testului:

  RFP=[FP/(FP+RN)]x100;

- valoarea predictivă pozitivă (**VPP**), sau probabilitatea posttest, este probabilitatea ca un individ cu valori pozitive ale testului să prezinte boala (= Specificitate crescută a testului):

  VPP=[RP/(RP+FP)]x100

  sau

  $$VPP = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori anormale reale}}{\text{nr. total al cazurilor cu valori anormale}} \times 100$$

- valoarea predictivă negativă (**VPN**) - este probabilitatea ca un individ cu valori negative ale testului să nu aibă boala (= Sensibilitate crescută a testului):

  VPN=[RN/(RN+FN)]x100

  sau

  $$VPN = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori normale reale}}{\text{nr. total de cazuri cu valori normale}} \times 100$$

- acurateţea globală a testului (**AG**) - este probabilitatea globală ca valorile pozitive sau negative ale testului să identifice corect prezenţa sau absenţa bolii:

  AG=[(RN+RP)/(RN+RP+FN+FP)]x100

Caracteristicile unui marker tumoral ideal sunt:

- sensibilitate 100% - capacitatea de a identifica toţi pacienţii cu tumoră, in stadiu cât mai precoce; specificitate 100% - capacitatea de a discrimina între indivizii sănătoşi şi cei cu neoplazii;
- specificitate de organ – capacitatea de a localiza tumora;
- corelaţie între concentraţia serică a markerului şi stadiul tumorii;
- capacitatea de a indica modificările induse de tratament;
- capacitate prognostică în funcţie de concentraţie.

Valoarea cut off: este o valoare a concentraţiei la care sensibilitatea şi specificitatea metodei sunt optime. De obicei corespunde concentraţiei la care specificitatea este de minimum 80% *(Figura 19.9)*.

Diagramele sensibilitate – specificitate (cunoscute sub numele de curbe ROC – Receiver Operating Characteristics) sunt indicatori utili ai valorii diagnostice a unui marker tumoral (*Figura 19.10* şi *Tabelul 19.XXVI)*.

		Tumora		
		Prezentă	**Absentă**	**Total**
Rezultatele testului markerului tumoral	***Pozitiv***	**RP (Real pozitiv)**	**FP (Fals pozitiv)**	**RP+FP**
	Negativ	**FN (Fals negativ)**	**RN (Real negativ)**	**FN+RN**
	Total	**RP+FN**	**FP+RN**	

Figura 19.8. Diagramă decizională - tabelul de contingenţă între prezenţa tumorii şi prezenţa markerului tumoral

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

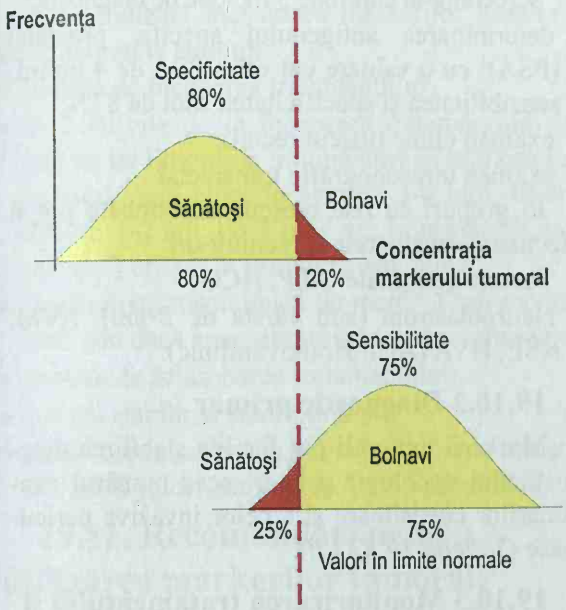


Figura 19.9. Stabilirea valorii *cut-off* în funcție de specificitatea şi sensibilitatea testului

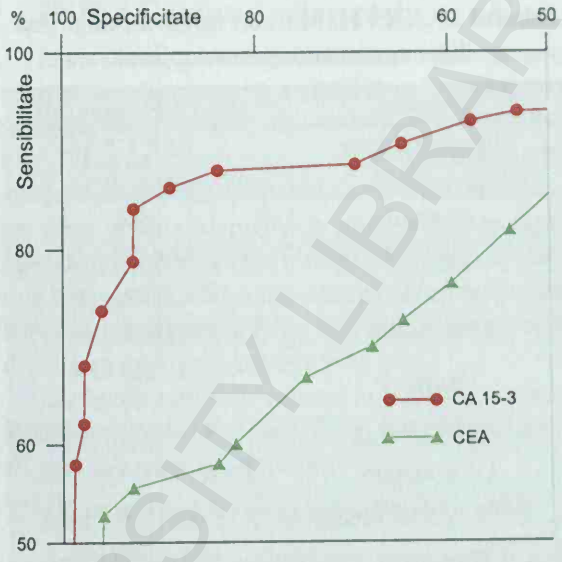


Figura 19.10. ROC (Receiver Operating Characteristics) pentru doi markeri tumorali în carcinomul mamar

19.9.5 Factori biologici care pot influența concentrația markerilor tumorali

Încă nu există un marker tumoral ideal sau un test universal de detectare a cancerului cu sensibilitatea de 100%, deoarece nu există nici un marker tumoral care să fie sintetizat exclusiv de țesutul tumoral şi care să nu fie detectabil în concentrații mai mici şi la persoane sănătoase sau cu boli benigne.

Concentrația markerilor tumorali poate fi influențată de următorii factori (în afara de prezența sau absența procesului malign):

1. Factorii care pot cauza rezultate fals pozitive:

- boli benigne, în primul rând boli inflamatorii degenerative;
- boli hepatice (AFP, CA 15-3, CA 19-9, CEA, TPA);
- boli renale (β2mg, CA 15-3, CA 19-9, calcitonina, CEA, PSA);
- tratamente (intervenții chirurgicale, chimio-radioterapie, necroza tumorală, liza tumorală);
- sarcina (AFP, CA 125, HCG), menstruația (CA 125);
- trecerea dintr-o secreție fiziologică în sânge (ex: CA 125 din lapte);
- medicamente (calcitonina, catecolamine etc.);

2. Factorii care pot cauza rezultate fals negative:

- numărul scăzut al celulelor maligne care sintetizează markerul respectiv;
- markerul tumoral rămâne în celulă sau pe suprafața celulei (nu este excretat);
- formează complexe imune cu anticorpi circulanți;
- sinteza de marker tumoral este blocată (ex: persoane cu antigene Lewis negative nu sintetizează CA 19-9);
- vascularizarea slabă a țesutului tumoral – markerul tumoral nu ajunge în circulația sanguină;
- viteza crescută de metabolizare sau excreție;
- alegerea „greşită" a markerului. Celula malignă sintetizează un alt marker tumoral. Sinteza de marker tumoral este modificată de obicei de o mutație, de metastaze sau de terapie.

Tabelul 19.XXVI. Criterii de alegere a markerilor tumorali

Sensibilitate	Specificitate	Utilitate
> 90% (foarte bună)	> 70% (bună)	Monitorizare sau screening persoane la risc
> 90% (foarte bună)	< 30% (slabă)	Monitorizare
< 40% (slabă)	> 80% (bună)	Monitorizare ?!

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 19.XXVII. Markeri tumorali de primă linie recomandaţi în neoplazii.

Tumori	Markeri tumorali
Hepatică primar	AFP, CEA
Germinale	AFP + HCG
Prostată	PSA
Gastrică	CA 72-4, CEA, TPA
Pulmonară cu celule mici	NSE, TPA, CEA
Pancreatică	CA 19-9, TPA
Ovariană	CA 125, TPA CA 72-4
Vezica urinară	TPA
Colo-rectală	CEA, TPA, CA 19-9
Neuroblastrom	AVM, HVA
Tiroidiană	Tireoglobulina, Calcitonina

19.9.6 Analize multiparametrice

Determinarea simultană a mai multor markeri tumorali are unele avantaje: detectează mai devreme şi mai precis tumorile sau recidiva, ajută la identificarea unor grupuri de pacienţi care necesită terapii diferite, astfel cresc semnificativ şansele terapeutice.

Determinarea mai multor markeri tumorali este necesară în următoarele situaţii:

- când tumorile sintetizează mai mulţi markeri (ovar, tiroidă, plamâni, colon etc.);
- când ţesutul tumoral nu secretă nici un marker tumoral într-o cantitate mare.

19.10 Evaluarea clinică

O serie de noi markeri tumorali sunt descoperiţi de la un an la altul. Din păcate, nici unul dintre markerii tumorali discutaţi mai sus nu îndeplineşte întru totul criteriile pentru un marker ideal. Nici unul nu este suficient de sensibil sau specific pentru a putea fi utilizat în screening-ul precoce al bolii. În continuare există anumite tipuri de tumori care, chiar în formă avansată, nu produc markeri, în ciuda faptului că sunt de dimensiune mare şi metastazează.

19.10.1 Screening

Sreeningul cancerului de prostată. Grupul cu risc crescut al cancerului de prostată cuprinde în primul rând bărbaţii cu vârste între 50 şi 70 de ani. La acest grup screening-ul descoperă 3-4 cazuri de cancer la fiecare 100 de persoane examinate. Cazurile de cancer pot fi descoperite cu 5 ani mai devreme de apariţia primelor semne clinice.

Screening-ul cuprinde 3 metode de diagnostic:

- determinarea antigenului specific prostatei (PSA); cu o valoare cut off a PSA de 4 ng/mL sensibilitatea şi specificitatea sunt de 87%;
- examen clinic (tuşeul rectal);
- examen utrasonografic transrectal

În grupuri cu risc crescut selecţionate pot fi efectuate următoarele screening-uri:

- Tumori germinale: AFP, HCG;
- Neuroblastrom (sub vârsta de 2 ani): AVM, NSE, HVA (Acid Homovanilinic).

19.10.2 Diagnostic primar

Markerii tumorali pot facilita stabilirea diagnosticului oncologic primar; scad numărul examinărilor costisitoare şi a celor invazive periculoase *(Tabelul 19.XXVII)*.

19.10.3 Monitorizarea tratamentului si evolutiei bolii

Acestea sunt cele mai importante indicaţii ale markerilor tumorali. Markerii tumorali pot indica recidiva tumorii cu mai multe luni înainte de apariţia simptomelor clinice.

1. Descreşterea concentraţiei markerului tumoral după tratament în 4-8 săptămâni (în funcţie de timpul de înjumătăţire) până la valori normale indică:
   - îndepărtarea totală a tumorii (după operaţie);
   - remisia sau scăderea volumului tumorii (după chimio- sau radioterapie).
2. Concentraţia markerului tumoral scade cu mai puţin de 20%, persistă valorile patologice sau chiar continuă să crească (cu peste 20 %) indică:
   - tumoră reziduală sau metastaze (după operaţie);
   - tratament parţial eficient (după chimio- sau radioterapie).
3. Concentraţia markerului tumoral prezintă o continuă creştere după o perioada de normalizare, indică:
   - recidivă (creşterea lentă a valorilor);
   - metastaze (creşterea rapidă a concentraţiei markerului tumoral);
   - rezistenţa la terapie, liza sau necroza tumorală (imediat după începerea tratamentului chirurgical, citostatic sau radiologic);
   - tulburări în catabolizarea sau eliminarea tumorii (ex: tulburări renale sau hepatice cauzate de chimioterapie).

Metastazele tumorii primare pierd frecvent capacitatea de a sintetiza markerul tumoral ceea ce poate cauza rezultate fals negative.

Este indicată măsurarea markerilor tumorali în următoarele situaţii:

- înainte de începerea tratamentului;
- la 2-10 zile de la începerea tratamentului în funcţie de timpul de înjumătăţire al markerului tumoral; apoi lunar în primele 3-6 luni; în următorii 1-2 ani: de 4 ori / an; în următorii 3-5 ani: de 2 ori/an; în următorii ani: anual;
- dacă există suspiciunea de recidivă sau metastază, sau dacă apar simptome / semne clinice;
- înainte de schimbarea tratamentului;
- pentru stabilirea stadiului bolii;
- dacă concentraţia markerului tumoral creşte sau arată valori patologice: la 2-3 săptămâni.

19.11. Recomandări pentru utilizarea markerilor tumorali

19.11.1 Cancerul hepatic

La majoritatea pacienţilor, cancerul hepatic cauzează creşterea nivelelor de α-fetoproteină (AFP). Dacă la un pacient cu hepatită cronică sau ciroză se găseşte un nivel ridicat al AFP se ridică suspiciunea unui cancer hepatic şi se vor efectua teste suplimentare pentru confirmare. În anumite regiuni geografice (Asia), unde prevalenţa cancerului hepatic este ridicată, AFP a fost utilizată cu succes pentru screening-ul acestui tip de cancer.

Acest marker tumoral poate fi folosit şi pentru evaluarea pacienţilor atât după intervenţia chirurgicală cât şi în urma tratamentelor de alt tip.

19.11.2 Cancerul pancreatic

Nici un marker tumoral nu este perfect pentru screening-ul cancerului pancreatic.

Majoritatea pacienţilor cu această afecţiune prezintă nivele serice crescute de CA 19-9. O valoare crescută a acestuia se corelează cu o probabilitate înaltă de existenţă a metastazelor. Deşi CA 19-9 oferă informaţii despre evoluţia şi prognosticul bolii, acest marker nu poate fi utilizat pentru a diagnostica neoplasmul pancreatic.

19.11.3 Cancerul gastric

Nu există nici un marker specific pentru acest tip de cancer. Unii markeri tumorali digestivi cum ar fi CEA, CA 72-4 şi CA 19-9 pot fi dozaţi în dinamică pentru evaluarea eficacităţii tratamentului dacă la momentul diagnosticului au avut valori crescute.

19.11.4 Cancerul colorectal

În cancerul colorectal avansat markerii tumorali cel mai frecvent crescuţi sunt CEA si CA 19-9, însă nici unul dintre aceştia nu este util ca test de screening. Valorile crescute ale CEA preoperator pot sugera un prognostic nefavorabil. Valorile mari preoperatorii trebuie să revină la normal în 4-6 săptămâni după intervenţia chirurgicală, dacă întreaga masă tumorală a fost îndepărtată. Mulţi clinicieni reevaluează nivelul CEA o dată la 3-6 luni pentru depistarea precoce a recurenţelor.

Dacă CEA nu este crescut la pacienţii cu boală avansată sau recurenţă, CA 19-9 poate fi folosit pentru evaluarea acestora.

19.11.5 Cancerul mamar

Nici un marker tumoral seric nu poate fi folosit pentru screening-ul sau diagnosticul cancerului mamar în stadiu incipient.

În momentul diagnosticului unui cancer mamar, ţesutul prelevat trebuie testat pentru a determina prezenţa sau absenţa receptorilor pentru estrogen şi progesteron, dar şi a antigenului HER2. Aceste teste oferă informaţii despre agresivitatea cancerului şi despre probabilitatea răspunsului terapeutic.

La pacienţii cu forme avansate de cancer se va folosi CA 15-3 şi CEA pentru evaluarea periodică şi depistarea recurenţelor după administrarea tratamentului. Se mai poate folosi şi testul CA 27.29 care măsoară acelaşi marker ca şi CA 15-3 dar într-un mod diferit. S-a observat că CA 15-3 şi CA 27.29 au o sensibilitate mai mare decât CEA. Descreşterea valorilor de CA 15-3 indică succesul terapeutic.

19.11.6 Cancerul ovarian

Cancerul ovarian epitelial (cea mai frecventă formă de cancer ovarian) este însoţit de nivele crescute ale CA 125. Uneori pot fi determinaţi şi alţi markeri: CA 72-4, CEA şi LASA-P (*Lipid Associated Sialic Acid in Plasma*).

Chiar şi în stadiile avansate, cancerul ovarian este greu de vizualizat prin investigaţii radiologice. Din acest motiv adesea se foloseşte CA 125 pentru evaluarea răspunsului la tratament şi depistarea recurenţelor.

În prezent nu se recomandă testarea CA 125 pentru screening-ul cancerului ovarian deoarece acesta nu poate depista prezenţa afecţiunii maligne suficient de precoce pentru a obţine îmbunătăţirea prognosticului *ad vitam*.

În tumorile ovariene cu celule germinale se observă valori crescute ale hCG şi/sau AFP. Acesti markeri sunt folosiţi în diagnosticul şi evaluarea pacienţilor pe termen lung.

19.11.7 Boala trofoblastică gestaţională

Tumorile trofoblastice includ *sarcina molară* şi *coriocarcinomul.* hCG este crescut în aceste tumori şi poate fi folosit pentru depistarea cancerelor la femeile care deşi nu sunt însărcinate prezintă uterul mărit. De asemeni, în timpul tratamentului pentru boala trofoblastică răspunsul terapeutic poate fi evaluat folosind hCG.

19.11.8 Cancerul testicular

HCG şi AFP sunt crescute în cancerul testicular. În cancerele testiculare *germinale (seminomatoase)* HCG are valori crescute la 10% dintre pacienţi. Nivelul AFP este normal la aceştia. În cazul cancerelor *non-germinale* mai mult de 50% dintre pacienţi prezintă nivele crescute de HCG şi/sau AFP. Valorile găsite în momentul diagnosticului nu oferă date prognostice.

În *coriocarcinom* (tumoră non-germinală) aproape întotdeauna există nivele crescute de HCG şi nivele normale de AFP. Spre deosebire de acesta, în cazul tumorii de sinus endodermal (sau *de sac vitelin* – tumoră non-germinală) se întâlneşte un nivel crescut de AFP fară creşterea HCG.

19.11.9 Cancerul prostatic

PSA este cel mai folosit marker pentru a detecta cancerul de prostată în stadii incipiente. De asemeni poate detecta recurenţele bolii canceroase. După intervenţia chirurgicală PSA trebuie să fie absent sau foarte scăzut. Pacienţii care au fost supuşi la radioterapie ar trebui să prezinte o scădere semnificativă a nivelului PSA, însă poate dura mai mulţi ani până când nivelul acestuia ajunge la valori normale. Creşterea concentraţiei PSA după tratament indică recurenţa bolii.

Cancerul prostatic cu celule mici (o formă rară de cancer), care deţine proprietăţi neuroendocrine, nu produce creşterea nivelelor serice ale PSA şi nici nu răspunde la terapia hormonală. Bărbaţii cu acest tip de cancer pot avea concentraţii crescute ale *cromograninei A.*

19.11.10 Cancerul de vezică urinară

Nici un marker tumoral dozat din urină nu este recomandat pentru screening-ul cancerului de vezică urinară. Pentru stabilirea unui diagnostic la pacienţii simptomatici se poate folosi BTA şi NMP22 împreună cu cistoscopia. Aceste teste mai pot fi utilizate pentru urmărirea evoluţiei pacienţilor după administrarea tratamentului. Totuşi, testele standard atât pentru diagnostic cât şi pentru urmărirea pe termen lung a pacientului sunt încă cistoscopia şi examenul citologic al urinii. Determinarea valorilor BTA si NMP22 se face adesea între cistoscopii. Dacă aceste valori sunt normale, cistoscopia se poate efectua mai rar. Trebuie subliniat faptul că dozarea BTA şi NMP22 nu poate înlocui cistoscopia şi examenul citologic.

În cazul unor forme avansate ale cancerului de vezică urinară pot creşte şi alţi markeri: CEA, CA 125, CA 19-9 sau TPA. Aceştia pot fi folosiţi pentru evaluarea pacientului în timpul şi după tratament.

19.11.11 Cancerul pulmonar

Nici un marker tumoral nu şi-a dovedit eficienţa ca test de screening pentru cancerul pulmonar.

În cancerul pulmonar cu celule mici creşte nivelul de NSE, iar în cancerul non-parvicelular găsim valori crescute al CEA. Aceşti markeri pot fi folosiţi pentru evaluarea răspunsului terapeutic. Există şi alţi markeri care ar putea fi folosiţi pentru evaluarea pacienţilor cu cancer pulmonar, însă de cele mai multe ori radiografia toracică sau alte teste imagistice transează diagnosticul.

19.11.12 Melanomul malign

Din păcate nici un marker tumoral nu poate depista această afecţiune în stadii incipiente. TA-90, S-100 şi alţi markeri pot fi utilizaţi pentru stabilirea diagnosticului pozitiv de melanom malign dintr-un fragment tisular. Nivele serice crescute ale TA-90 pot sugera utilitatea determinărilor secundare, însă cu o specificitate scăzută, concentraţii ridicate putând fi găsite şi în absenţa melanomului metastazat.

19.11.13 Mielomul multiplu

Nu există markeri tumorali care pot fi utilizaţi pentru screening-ul acestei afecţiuni. Totuşi identificarea imunoglobuinelor patologice este un test folositor în stabilirea diagnosticului. Prin electroforeza şi imunofixare se pot pune în evidenţă aceste imunoglobuline atât în sânge cât şi în urină. La pacienţii cu mielom multiplu pot fi detectate fragmente imunoglobulinice în urină (lanţuri uşoare libere k sau λ), denumite *proteine Bence-Jones.* În acelaşi timp majoritatea pacienţilor prezintă nivele serice detectabile ale unui tip de imunoglobulină patologică denumită *proteină monoclonală* sau *proteina M.* Prezenţa

acesteia duce la apariţia unui *gradient monoclonal* pe traseul electroforetic. Deşi prezenţa acestor proteine poate ridica suspiciunea unui mielom multiplu, pentru confirmarea diagnosticului este necesară o biopsie medulară.

Mulţi dintre pacienţii cu mielom multiplu prezintă nivele crescute ale β2-mg. Acest marker, împreună cu testele menţionate mai sus, pot oferi date despre eficienţa terapeutică şi prognosticul pacienţilor.

19.12 Proteomica. Un nou nivel de înţelegere a malignităţii

În timp ce ADN este doar o arhivă informaţională, activitatea celulei este susţinută de proteine. Existenţa unei anumite secvenţe ADN nu garantează sinteza proteinei corespunzătoare. În acelaşi timp, secvenţa ADN nu este suficientă pentru a descrie structura proteică, funcţia şi localizarea celulară. Versatilitatea şi complexitatea proteică rezidă din modificările posttranslaţionale (fosforilare, sulfatare, glicozilare). Mai mult, codul genetic nu oferă informaţii despre modul în care proteinele formează reţele şi mecanisme funcţionale în cadrul unei celule. De fapt, activarea unei căi de transmitere a unui semnal care comandă migrarea celulară, apoptoza sau diviziunea, poate avea loc instantaneu înainte ca o modificare în expresia ADN/ARN să se poată produce.

Termenul de *proteom*, care caracterizează totalitatea proteinelor codificate de *genom*, a fost propus în 1994. Proteomica este considerată etapa superioară *genomicii.* Unul dintre dezideratele actuale ale oamenilor de ştiinţă este să creeze o bază de date care să cuprindă toate proteinele. Până în prezent numai o mică parte a proteomului a fost prelucrată. Pentru analiza proteinelor nu există (nu s-a inventat încă) o metodă analitică de puterea şi valoarea diagnostică a PCR pentru acizii nucleici, astfel încât progresele în acest domeniu se fac relativ lent. Deşi comunitatea ştiinţifică a propus o serie de noi tehnici de investigaţie (cum ar fi tehnologia xMAP), metoda de elecţie continuă să fie *electroforeza bidimensională în gel.* Aceasta separă proteinele în funcţie de greutatea lor moleculară (pe o dimensiune) şi încărcătura electrică (în a doua dimensiune). Când o soluţie proteică este aplicată pe gelul bidimensional proteinele sunt separate în specii proteice alcătuite dintr-un singur tip de proteine. Aceste puncte de concentrare proteică de pe gelul de electroforeză pot fi analizate cantitativ pentru a monitoriza evoluţia unei anumite proteine sub tratament.

19.12.1 Cancerul la nivel molecular

Cercetările din domeniul genomicii şi proteomicii furnizează un nou nivel de informaţii funcţionale despre bazele moleculare ale cancerului. Aceste informaţii vor constitui temelia unei noi ere a medicinei moleculare aplicată pentru cancer. Această revoluţie a medicinei moleculare poate fi împărţită în trei faze:

- *Prima fază* este descoperirea genelor; în această fază au fost identificate şi secvenţiate gene anterior necunoscute. Cea mai mare realizare a acestei faze este finalizarea Proiectului Genomului Uman în 2003, după 50 de ani de la descoperira dublului-helix ADN.
- *A doua fază* este *amprentarea* moleculară; aceasta corelează statusul *genomic*, *pattern-ul de expresie* al ADN complementar (ADNc – este ADN sintetizat din ARNm sub acţiunea revers-transcriptazei) şi *repertoriul proteic* cu *statusul funcţional* al celulei sau ţesutului. Prin studiul pattern-urilor de expresie se încearcă obţinerea de informaţii despre molecule importante din punct de vedere funcţional pentru dezvoltarea patologiei umane. Aceste date mai pot fi folosite şi în subclasificarea morfopatologică a tumorilor, ceea ce va asigura un tratament adecvat fiecărui pacient în parte.
- *A treia fază* constă în corelarea informaţiilor proteomice cu circuitele şi căile funcţionale celulare. Pentru aceasta trebuie să luăm în considerare dinamica modificărilor proteice posttranslaţionale şi interacţiunile proteină-proteină sau proteină-ADN. Toate acestea permit o analiză la nivel molecular a tumorii pentru a identifica elementele care duc la tumorigeneză. Printr-o analiză genomică/proteomică integrată rezultatul final va fi înţelegerea funcţională a evenimentelor moleculare care stau la baza dezvoltării celulare normale şi patologice. Acest nivel înalt al înţelegerii funcţionale va costitui baza unui design terapeutic cu adevarat raţional a cărui ţintă sunt leziunile moleculare răspunzătoare de apariţia bolii.

19.12.2 Provocările medicinei moleculare post-genomice

Secvenţierea genomului uman a oferit posibilitatea înţelegerii mecanismelor genetice care stau la baza dezvoltării cancerului. Încheierea secvenţierii genomului uman este doar începutul din ceea ce pare a fi o nouă eră în medicină. Mai puţin de 2% din bolile umane non-infecţioase sunt

monogenice. Restul sunt poligenice (cauzate de mai multe gene în acelaşi timp) sau epigenice (cauzate de modificări non-genetice sau post-genetice ale moleculelor celulare). Aşadar, elucidarea proteomului uman implică identificarea tuturor proteinelor şi a posibilelor variaţii morfologice şi funcţionale ale acestora. Astfel o înţelegere completă a bazelor moleculare ale cancerului depinde de o abordare multidisciplinară combinând genetica, patologia, structura şi funcţia proteică, biologia celulară, bioinformatică şi medicina clinică.

Genele exprimate în mod curent şi elementele lor reglatoare reprezintă o mică proporţie a genomului unei celule. Numărul total al genelor exprimate în timpul vieţii poate fi de aproximativ 20000. Totuşi, pentru o celulă, numărul genelor în uz curent este de aproximativ 4000. Dintre acestea numai o mică parte sunt susceptibile la acţiunea factorilor carcinogeni. Produşii proteici ai genelor susceptibile pot fi reglatori ai unor căi de control a proliferării celulare, diferenţierii sau apoptozei. Aşadar, în vederea tipizării moleculare a cancerului este important să se identifice acel subset de gene aflate în corelaţie sau în relaţie de cauzalitate cu dezvoltarea şi progresia cancerului.

Este foarte probabil ca majoritatea cancerelor să-şi aibă originea în ţesuturi cu un genom normal. Evenimentele carcinogenice produc modificări genetice (transmisibile pe cale ereditară), care dau naştere stărilor premaligne (hiperplazia şi displazia) înaintea apariţiei cancerului propriuzis. Identificarea modificărilor genetice importante, a genelor şi proteinelor implicate cauzal, depind de posibilitatea *analizei ţesutului tumoral* combinată cu informaţii obţinute prin folosirea *animalelor de experienţa* şi a *culturilor celulare*. În timpul progresiei somatice a cancerului la oameni, celulele tumorale acumulează un număr mare de mutaţii, translocaţii cromozomiale, deleţii hetero- şi homozigote, mutaţii punctiforme sau locusuri cu amplificare genică. Numai unele din aceste modificări (sau poate doar *una* singură) constituie elementul *trigger* necesar pentru creşterea, invazia şi metastazarea tumorii. Aşadar, cantitatea proteinelor, modificările posttranslaţionale şi asocierile proteină-proteină pot oferi o imagine de ansamblu asupra căii de conducere a semnalelor implicate în carcinogeneză. Această cale de transmitere a semnalului este cea mai bună ţintă pentru terapia antitumorală.

19.12.3 Complexitatea problemei

Proteomica este mai complexă decât genomica deoarece genomul unui organism rămâne constant, în timp ce proteomul diferă în funcţie de timp şi de la o celulă la alta.

Determinarea proteinelor se făcea în trecut analizând ARNm. Astăzi se ştie însă că ARNm nu este întotdeauna translatat pentru a forma o proteină, iar cantitatea de proteine translatate dintr-un ARNm, depinde de gena de pe care a fost transcris precum şi de starea fiziologică a celulei.

Proteomica se ocupă de studiul calitativ al unei proteine (dacă este sau nu prezentă) şi de cel cantitativ.

19.12.3.1 Modificări posttranslaţionale

Posibile diferenţe între proteinele codificate de aceeaşi genă rezultă încă din momentul translaţiei ARNm, însă după acest proces, proteinele suferă şi alte modificări de natură chimică. Cele mai multe dintre aceste modificări postranslaţionale au un rol decisiv pentru funcţiile proteinelor la nivel celular.

Fosforilarea. Acest proces vizează numeroase enzime şi proteine structurale responsabile de comunicarea inter- sau intracelulară. Adăugarea unor grupări *fosfat* unor aminoacizi (de regulă serină şi treonină, prin intermediul serin- sau treonin-kinazei; mai rar tirozină cu ajutorul tirozin-kinazei), oferă proteinei capacitatea de a interacţiona cu alte proteine, care pot recunoaşte domeniul forforilat.

Ubiquitinarea. *Ubiquitina* este o proteină de mici dimensiuni care poate fi asociată anumitor substrate proteice de către o familie de enzime denumite ubiquitin-ligaze E3. Determinarea proteinelor poli-ubiquitinate poate oferi informaţii despre mecanismele reglatoare ale căilor de transmitere implicate în sinteza proteică. De asemeni, determinarea substratelor fiecărei ubiquitin-ligaze coroborat cu cuantificarea expresiei genelor răspunzătoare de sinteza acestor ligaze în diferite celule se poate dovedi de un real folos.

Modificări adiţionale. Pentru a discuta toate modificările care pot fi studiate în cadrul proteomicii ar trebui abordată cea mai mare parte a biochimiei. Aşadar numai o parte vor fi enumerate: metilarea, acetilarea, glicozilarea, oxidarea şi nitrozilarea. Unele proteine trec prin toate aceste modificări, adesea formând combinaţii dependente de timp, ceea ce complică şi mai mult abordarea acestei probleme.

19.12.4 Analiza moleculară folosind tehnica microdisecției tisulare

Analiza moleculară a populațiilor celulare purificate din mediul tisular nativ, este țelul geneticii moderne. Atingerea acestui țel este dificilă deoarece țesuturile sunt structuri tridimensionale complicate alcătuite dintr-un număr mare de populații celulare distincte care interacționează într-un mod complex. Subpopulația celulară vizată poate reprezenta doar o fracțiune microscopică din țesutul prelevat. De exemplu, fragmentul bioptic din țesutul mamar care adăposteşte o tumoră malignă, conține de obicei următoarele tipuri de celule:

- Celule adipoase din țesutul adipos abundent în jurul ductelor;
- Epiteliu normal şi mioepiteliu din ducte;
- Fibroblaşti şi celule endoteliale din stromă şi vasele sanguine;
- Celule carcinomatoase premaligne din leziunile *in situ;*
- Mănunchiuri de celule carcinomatoase.

Dacă dorim să analizăm modificările genetice din celulele premaligne şi maligne, trebuie să ştim că aceste subpopulații sunt de regulă localizate în regiuni microscopice care ocupă mai puțin de 5% din volumul țesutului analizat. Se ştie însă că o contaminare a probei tisulare cu alte celule va oferi date eronate în urma analizării cu aparatură automatizată. Cultivarea populațiilor de celule se face tocmai cu scopul de a reduce contaminarea. Însă celulele cultivate riscă să nu mai prezinte aceleaşi evenimente moleculare ca şi cele care au loc în țesutul din care derivă. Chiar dacă se reuşeşte izolarea şi cultivarea celulelor respective în condiții optime, expresia genică poate fi foarte diferită în acest mediu de cultură. Asta se întâmplă pentru că celulele cultivate nu mai sunt în legătură cu anumiți factori responsabili de reglarea genică: factori solubili, molecule matriceale extracelulare, factori de comunicare intercelulară. Aşadar, problema heterogenității celulare a fost o importantă barieră în calea analizei moleculare a țesutului normal şi patologic. Această problemă poate fi acum soluționată prin dezvoltarea noilor tehnici de *microdisecție.*

Analiza genelor şi a tiparelor proteice pentru țesutul cu dezvoltatare normală şi cel patologic se face prin microdisecția şi extracția unei subpopulații omogene din mediul tisular, care poate fi apoi comparată cu alte subpopulații de celule adiacente dar distincte. În acest scop a fost dezvoltată tehnica microdisecției cu captură laser (*Laser Capture Microdisection - LCM*).

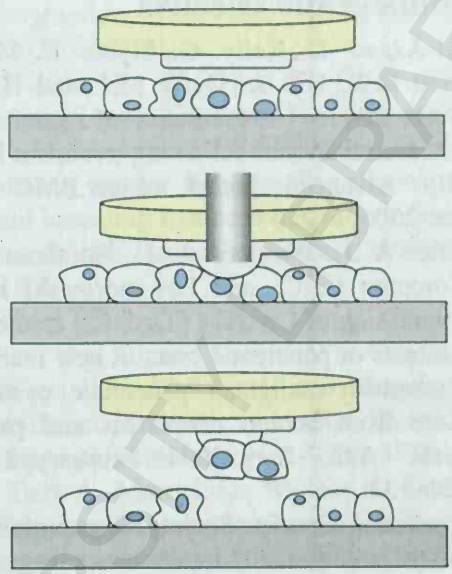


Figura 19.11. Reprezentarea schematică a microdisecției cu captură laser. LCM are rolul de a prelева subpopulații de celule în vederea analizei fără a le contamina cu alte celule. Se pot selecta celulele care urmează să fie studiate de pe ecranul calculatorului. Celulele alese sunt ascensionate cu ajutorul unei raze LASER. LASER-ul cu infraroşu montat pe axa optică a microscopului expandează un polimer termoplastic care ajunge pe lamă şi capturează celula/celulele selectate de sub raza LASER. Când filmatul este ascensionat doar celulele selectate vor fi prelevate pentru studiu.

Tehnica LCM permite determinarea tiparelor de expresie pentru anumite gene. În acest scop se pot obține populații purificate de celule, din care se va extrage ARN, acesta va fi copiat pe ADNc şi hibridizat ulterior. Folosind tehnica LCM una până la câteva mii de celule pot fi prelevate în mai puțin de 5 minute. Conformația proteică şi activitatea enzimatică se păstrează dacă țesuturile sunt înghețate înaintea aplicării colorației, Astfel se poate obține pattern-ul de expresie genică pentru orice patologie identificabilă histologic. Folosind LCM în combinație cu metodele moderne de analiză (analiză mutațională, PCR în timp real) putem vizualiza interacțiunile tridimensionale dintre elementele constitutive ale țesutului examinat (*Figura 19.11*).

Bibliografie selectivă

1. Al-Azawi D., Kelly G., Myers E., McDermott E.W., Hill A., Duffy M.J., and Higgins N.O.: CA 15-3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer.BMC Cancer. 2006; 6: 220
2. Alles A .J., Warshaw A. L., Southern J. F., Compton C. C., and Lewandrowski K. B.: Expression of CA 72-4 (TAG-72) in the fluid contents of pancreatic cysts. A new marker to distinguish malignant pancreatic cystic tumors from benign neoplasms and pseudocysts. Ann. Surg. 1994 February; 219(2): 131–134.
3. American Cancer Society. Prevention and Early Detection. 2010 www.cancer.org
4. Bernardo H.L., Jeffrey W. C., Gregory Y.L., David P.R., Grenon N., Muzikansky A., and Zhu Long A.X.: term survivors with metastatic pancreatic adenocarcinoma treated with gemcitabine: a retrospective analysis. J. Hematol Oncol. 2009; 2: 13.
5. Catalona W.J., Partin A.W., Slawin K.M., et al: Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. JAMA 1998;279:1542.
6. Chan D.W., Booth R.A., Diamandis E.P.: Tumor markers. In: Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E., ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 3rd. ed. St.Louis:Elsevier Saunders; 2006:745-795
7. Chang K-H., Ryu H-S., Suk-Joon C., Young-Ji B., and Jung-Pil L.: Relationship between Pre-treatment Serum SCC (squamous cell carcinoma) Antigen, Cyfra 21-1 Levels, and Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. Cancer Res Treat. 2005 October; 37(5): 302-306
8. Chen C-Y., Su C-Y., Chien C-Y., Huang C-C., Chuang H-C., Fang F-M., Huang H-Y., Chen C-M., and Chiou S-J.: Overexpression of β2-microglobulin is associated with poor survival in patients with oral cavity squamous cell carcinoma and contributes to oral cancer cell migration and invasion: Br J Cancer. 2008 November 4; 99(9): 1453–1461
9. Coffman L.G., Parsonage D., D'Agostino R., Torti Jr. F.M., and Torti S.V.: Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 January 13; 106(2): 570–575
10. Colantonino D.A., Chan D.W.: The clinical application of proteomics. Clin Chim Acta 2005; 357:151-158
11. De Gennaro L., Brunetti N.D., Bungaro R., Montrone D., Cuculo A., Pellegrino P.L., Correale M., Di Biase M. Carbohydrate antigen-125: additional accuracy in identifying patients at risk of acute heart failure in acute coronary syndrome. Coron Artery Dis. 2009 Jun;20(4):274-80.
12. Demirci H., Erdamar H., Karakoc A., Akturk M., Yilmaz M., Arslan M.: CA 72-4 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. International Journal of Clinical Practice, Volume 64, Number 1, January 2010 , pp. 34-38(5)
13. Department of Clinical Biochemistry, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh EH3 9YW, United Kingdom. The National Academy of Clinical Biochemistry: Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic. (Laboratory Medicine Practice Guidelines), 2002, 40-42
14. DeVita V.Jr., Lawrence T., Rosenberg S.: Cancer Principles & Practice of Oncology. 2008; 14-16
15. Diamandis E.P.: Tumor markers: past, present and future. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lijia H, et.al. ed. TumorMarkers. Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications, Washington,DC: AACC Press; 2002:3-8
16. Duffy M. J. and Crown J. : A Personalized Approach to Cancer Treatment: How Biomarkers Can Help. Clinical Chemistry. 2008;54:1770-1779.
17. Duffy M.J.: Evidence for the clinical use of tumour markers. Ann Clin Biochem 2004;41:370-377
18. Grammatopoulos D., Elliott Y., Smith S. C., Brown I., Grieve R. J., Hillhouse E. W., Levine M. A., and Ringel M.D. : Measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood as an adjunctive test for monitoring thyroid cancer. Mol Pathol. 2003 June; 56(3): 162–166
19. Hayat M.A. :Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis, 2008, Vol.2:400-415.

20. Hayat M.A.: Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis. Vol.2, General methods and Overviews, Lung Carcinoma and Prostate Carcinoma; 2008: 38-39
21. Heizmann C.W., Fritz G., Schäfer B.W.: S100 proteins: structure, functions and pathology. Front Biosci. 2002 May 1;7:d1356-68
22. Howaizi M., Abboura M., Krespine C., Sbai-Idrissi M-S., Marty O., and Djabbari-Sobhani M.: A new cause for CA19.9 elevation: heavy tea consumption. Gut. 2003 June; 52(6): 913–914.
23. Hua X., Bingjian L., and Maode L.: The cancer secretome: a reservoir of biomarkers .J Transl Med. 2008; 6: 52.Published online 2008 September 17. doi: 10.1186/1479-5876-6-52
24. Louhimo J., Alfthan H., Stenman U., Haglund C.: Serum HCG and CA 72-4 Are Stronger Prognostic Factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in Pancreatic Cancer. Oncology 2004;66:126-131 (DOI: 10.1159/000077438)
25. Max J., Salunga R., Tuggle J.T., et al. : Gene expression profiles of human breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:5974.
26. Nakata B., Takashima T., Ogawa Y., Ishikawa T. and Hirakawa K.: Serum CYFRA 21-1 (cytokeratin-19 fragments) is a useful tumour marker for detecting disease relapse and assessing treatment efficacy in brest cancer. British Journal of Cancer (2004) 91, 873 – 878
27. Shun Zhang, Yi-Ming Wang, Chuan-Dong Sun, Yun Lu, and Li-Qun Wu: Clinical value of serum CA19-9 levels in evaluating resectability of pancreatic carcinoma.World J Gastroenterol. 2008 June 21; 14(23): 3750–3753
28. Taira A., Merrick G., Wallner K., Dattoli M.: Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. Oncology (Williston Park). 2007 Jul;21(8):1003-10
29. Volk M.L., Hernandez J.C., Su G.L., Lok A.S., Marrero J.A.: Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3. Cancer Biomark. 2007;3(2):79-87
30. Zhu H., Bilgin M., Snyder M.: Proteomics. AnnuRevBiochem 2003; 72:783-812

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 20.
Patochimia funcţiilor renale

Minodora Dobreanu, Annamaria Földes, Sorin Gîju

Rinichii au roluri fundamentale în menţinerea homeostaziei mediului intern, prin excreţia unor produşi de degradare dispensabili şi conservarea altora; participă de asemenea la reglarea presiunii arteriale şi a eritropoezei. Principalele funcţii ale rinichiului sunt:

- ***Funcţia excretorie*** - de eliminare prin urină a unor produşi de metabolism solubili, nevolatili (uree, creatinină, acid uric, bilirubină, electroliţi, metaboliţii diverşilor hormoni etc.), precum şi a unor substanţe străine (medicamente, aditivi alimentari), metabolizate prin enzimele xenobiotice;
- ***Funcţia homeostatică*** - de menţinere constantă a volumelor, osmolarităţii, compoziţiei organismului şi a echilibrului hidro-electrolitic. De asemenea, participă la reglarea echilibrului acido-bazic în cooperare cu plămânul şi cu diverse sisteme tampon extracelulare;
- ***Funcţia endocrino-umorală*** - prin biosinteza unor produşi cu rol reglator: renina, eritropoetina, 1,25-dihidroxi-colecalciferolul. ***Renina*** este sintetizată de celulele mioepiteliale (granulare) din peretele arteriolei aferente aflată în structura aparatului juxtaglomerular; este componentă a sistemului renină-angiotensină-aldosteron (RAA), având rol deosebit în homeostazia presiunii arteriale. ***Eritropoetina*** este un hormon peptidic elaborat în interstiţiul renal de celulele endoteliale, fibroblaşti şi realizează homeostazia hematopoetică. În lipsa eritropoetinei apare anemia renală. ***1,25-dihidroxi-colecalciferolul*** e forma activă a vitaminei D cu rol în homeostazia fosfo-calcică.
- ***Funcţia metabolică*** - de catabolizare a unor hormoni polipeptidici (insulină, glucagon, PTH, gastrină, vasopresină) şi de gluconeogeneză.

20.1 Elemente de structură renală

Pe o secţiune longitudinală rinichiul este format din:

- ***sinusul renal*** - care conţine calicele şi porţiunea superioară a pelvisului renal;
- ***parenchimul renal*** - care acoperă sinusul pe toate părţile, cu excepţia hilului. Se disting corticala (*cortex renis*) şi medulara (*medulla renis*). Corticala se află dispusă la periferia organului cu o grosime de aproximativ 10 mm. Medulara este alcătuită din structuri conice numite piramidele lui Malpighi, care sunt direcţionate cu baza spre suprafaţa organului şi vârfurile spre sinus.

Unitatea morfo-funcţională renală este *nefronul.* La om fiecare rinichi posedă aproximativ 1 milion de nefroni. Nefronul este compus din glomerulul renal şi tubul renal. Glomerulii renali se află dispuşi la nivelul corticalei. Capsula Bowman se continuă cu tubul contort proximal (TCP). Apoi, tubul coboară în piramidă, formează ansa Henle şi se întoarce în corticală. Segmentul terminal al tubului renal drenează în tubul colector, care primeşte mai mulţi tubi şi traversează în linie dreaptă corticala şi medulara. Schema structurală a nefronului este prezentată în *Figura 20.1.*

20.1.1 Glomerulul renal

Are forma unei sfere cu diametrul de 200 µm, care posedă un pol vascular - în care intră arteriola aferentă şi iese arteriola eferentă - şi un pol urinar care se continuă cu TCP.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Glomerulul este compus din:

1. o rețea capilară căptușită cu un strat subțire de celule endoteliale;
2. o regiune centrală în care se află celule mezangiale;
3. celule epiteliale viscerale ale capsulei Bowman și membrana bazală asociată acestora;
4. stratul parietal al capsulei Bowman cu membrana sa bazală.

Între straturile epiteliale există spațiul Bowman (spațiul urinar) care se continuă cu TCP. Capilarele glomerulare sunt tapetate cu un endoteliu fenestrat subțire. Nucleul celulelor endoteliale e adiacent mezangiului. Celulele endoteliale au suprafața electronegativă, reprezentând o barieră împotriva trecerii constituenților sanguini macromoleculari anionici din lumenul capilar în spațiul Bowman. Membrana bazală glomerulară (MBG) este alcătuită din trei straturi: unul central- *lamina densa*, două straturi mai puțin dense electronomicroscopic - *lamina rara* interna și externa. Celulele epiteliale viscerale ale capsulei Bowman se numesc podocite și posedă niște prelungiri citoplasmatice care se divid în procese pediculate numite pedicele („*picioruşe*"). Celulele epiteliale parietale sunt celule scuamoase și formează peretele extern al capsulei Bowman; se continuă brusc cu celulele cilindrice ale TCP.

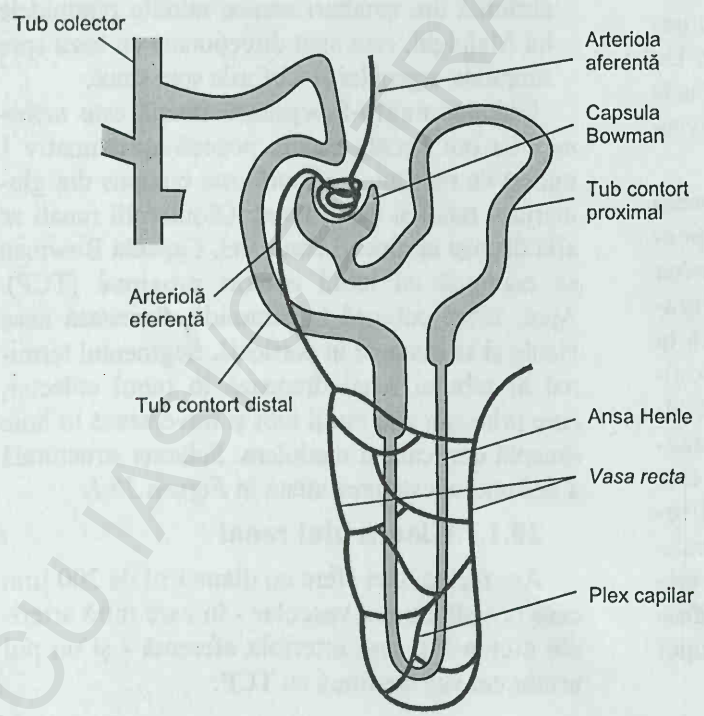


Figura 20.1. Structura schematică a nefronului

Pentru a traversa peretele capilar, o moleculă trebuie să treacă prin endoteliul fenestrat, membrana bazală glomerulară și diafragma epitelială a capsulei Bowman. Celulele mezangiale dețin proprietăți de celulă musculară netedă, jucând rol contractil și fagocitar.

Filtrarea lichidului plasmatic are loc în glomeruli prin 3 straturi poroase, suprafața filtrantă glomerulară fiind de 1,56 m^2. Primul strat filtrant, endoteliul capilar, are lacune intercelulare cu diametrul între 50 - 100 nm; diametrul porilor membranelor bazale glucozaminoglicanice pericapilare este între 3 - 7 nm, iar stratul epitelial extern al capsulelor lui Bowman dispune de pori, având diametrul între 20 - 50 nm (*Figura 20.2*).

La presiunea filtrantă efectivă (35 - 45 mbar), prin acești pori pot traversa apa, ionii și substanțele organice cu molecularitate redusă. Proteinele se filtrează selectiv, în funcție de masele lor moleculare, iar elementele figurate (hematiile) se reține în sânge, cu excepția PMN și a macrofagelor, capabile de diapedeză.

20.1.2 Tubul renal

Este constituit din trei porțiuni: TCP, ansa Henle (cu ramura descendentă subțire care se curbează și se continuă cu ramura ascendentă subțire și apoi groasă) și TCD. Mai mulți tubi renali se varsă într-un tub colector.

Tubul contort proximal (TCP) al nefronului este format dintr-un strat de celule epiteliale cilindrice, având marginea *„în perie"* spre lumen și un labirint bazal spre *vasa recta*, localizate în jurul tubilor în urma recapilarizării vasului eferent. Aceste celule posedă numeroase mitocondrii și joncțiuni intercelulare puțin etanșe. La nivelul TCP :

- se reabsorb izoosmotic două treimi din apa filtratului glomerular;
- se reabsorb complet: glucoza, aminoacizii, proteinele, HCO_3^-, K^+, vitamina C;
- se reabsoarbe 75% din Na^+ filtrat;
- se reabsorb la un nivel mai redus decât apa: urea (50%), acidul uric, fosfații (70%) și sulfații (60%) (*Tabel 20.1*);
- se secretă histamină, acid hipuric, creatinină.

Ansa Henle este continuarea spre pielon a tubului contort proximal. În rinichi există două populații principale de nefroni: 85% din nefroni au *ansa Henle scurtă* (acești nefroni își au originea în glomerulii de suprafață și din mijlocul cortexului, vârful ansei

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 20.I. Localizarea proceselor de reabsorbție și secreție în tubii renali

Nr.	Segmentele tubulare	Reabsorbția tubulară	Secreția tubulară
1.	TCP	- 100% glucoza, proteinele, HCO_3^-, K^+, vitamina C, aminoacizii, hemoglobina; - 75% Na^+; - 70% apa; - 60% ureea; - Cl^-, Ca^{2+}, Mg^{2+}, acidul uric, fosfați, sulfați	- acidul hipuric; - acizi organici; - ureea; - creatinina; - histamina
2.	Segment descendent ansă Henle	- apa	
3.	Segment ascendent ansă Henle	- Na^+, Cl^-, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}	
4.	TCD	- ureea, proteinele; - Na^+, Cl^-, apa, Ca^{2+}, Mg^{2+}, HCO_3^-; - baze și acizi organici	- acidul uric; - H^+; - NH_3
5.	Tubul colector	- ureea; - Na^+, Cl^-, apa, K^+	- H^+, NH_3; - K^+

oprindu-se în cortexul renal), iar 15% din nefroni au *ansa Henle lungă* (cu originea în glomerulii juxtamedulari localizați lângă joncțiunea cortico-medulară, ansa Henle pătrunzând în medulara internă). Ramura descendentă a ansei Henle posedă celule epiteliale aplatizate cu puțini microvili, mitocondrii rare, joncțiuni permeabile (zona fiind de transport pasiv pentru apă și electroliți), iar în ramura ascendentă celulele sunt cubice, fără vili, bogate în mitocondrii, joncțiuni bine organizate, cu posibilități de transport activ al ionilor:

- porțiunea descendentă este foarte permeabilă pentru apă și moderat permeabilă pentru uree și Na^+;
- porțiunea ascendentă subțire e foarte puțin permeabilă pentru apă și mult mai permeabilă pentru uree;
- porțiunea ascendentă groasă este special adaptată transportului activ al ionilor de Na^+, K^+, Cl^-. Interstițiul devine hiperosmotic, iar urina din lumen hipoosmotică. La acest proces de creștere a osmolarității interstițiului medular participă și difuziunea ureei din tubii colectori în interstițiu. Segmentul gros e impermeabil pentru apă și uree (*Tabelul 20.I*).

Tubul contort distal (TCD) este format din celule epiteliale plate, fără microvili și cu un labirint bazal mai puțin dezvoltat; celulele posedă numeroase mitocondrii dispuse în palisadă, iar complexele joncționale sunt bine dezvoltate. De la nivelul părții ascendente a ansei, tubul se întoarce în corticală. O grupă de celule, alcătuind *macula densa* a tubului contort distal, sunt așezate în strânsa apropiere a celulelor mioepiteliale din peretele vasului aferent. Din corticală, sub forma tubului colector, coboară din nou în medulară. În TCD se reabsorb majoritatea ionilor, dar este impermeabil pentru apă și uree. Totuși, sub influența aldosteronului, TCD devine permeabil pentru ionii de Na^+ și concomitent se creează un gradient electrochimic ce antrenează secreția ionilor de K^+ și H^+ în lumenul tubular. Amoniacul (NH_3) este, de asemenea, secretat în TCD și în combinație cu ionii de H^+ se excretă sub formă de ioni amoniu (NH_4^+) (*Tabelul 20.I*).

Tubii colectori au celule epiteliale plate. Prin confluență mai mulți tubi colectori se adună într-un singur tub comun, care se deschide în bazinetul renal, la vârful câte unei piramide renale. Pereții tubilor colectori sunt permeabili față de apă numai în prezența hormonului antidiuretic (ADH); din lichidul hipoosmotic intratubular, apa trece spontan (fără nici un aport ener-

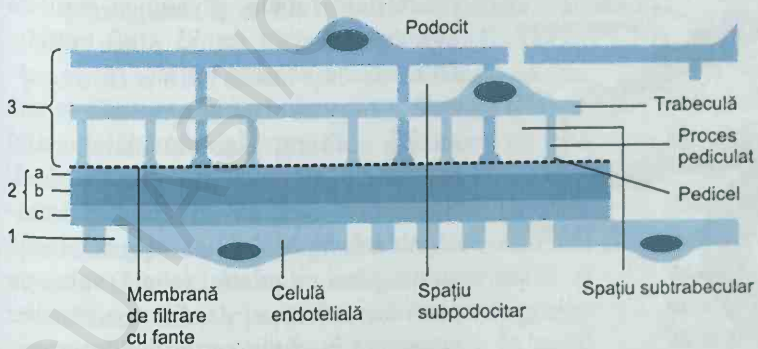


Figura 20.2. Filtrul renal – schema: 1. strat endotelial intern (*lamina fenestrata*); 2. MBG cu: a) *lamina rara externa*; b) *lamina densa*; c) *lamina rara interna*; 3. strat epitelial extern podocitar.

getic) în interstițiul hiperosmotic, ducând la concentrarea urinei definitive. În caz contrar, se elimină o urină diluată și voluminoasă. Ductele colectoare prezintă permeabilitate pentru uree, de aceea o parte din uree se absoarbe în medulara renală. Dar cea mai mare parte din uree retrodifuzează în ansa Henle, revenind apoi în ductele colectoare de unde este excretată în final. Tot în acest segment se secretă ioni de H^+ cu rol în menținerea echilibrului acido-bazic (*Tabelul 20.I*).

În timp ce TCP este responsabil de reabsorbția masivă din filtratul glomerular, TCD exercită un control fin asupra compoziției fluidului tubular în concordanță cu necesitățile organismului.

20.1.3 Aparatul juxtaglomerular renal

Descris de Goormaghtigh, este alcătuit dintr-o componentă vasculară și una tubulară (*Figura 20.3*). Produce, depozitează și secretă doi factori renali: *renina* și *eritropoietina* - glicoproteina purtătoare de semnale.

Componenta vasculară este formată din porțiunea terminală a arteriolei aferente, porțiunea inițială a arteriolei eferente și regiunea mezangială extraglomerulară (*lacis*). În componenta vasculară intră două tipuri de celule: celulele juxtaglomerulare granulare (mioepiteliale) ce secretă renina și celulele mezangiale extraglomerulare agranulare (celulele lacisului sau celulele *polkissen* ale lui Goormaghtigh). Lacisul se învecinează cu celulele *maculei densa*.

Componenta tubulară este *macula densa*, reprezentată de porțiunea tubului contort distal (TCD) care vine în contact cu componenta vasculară.

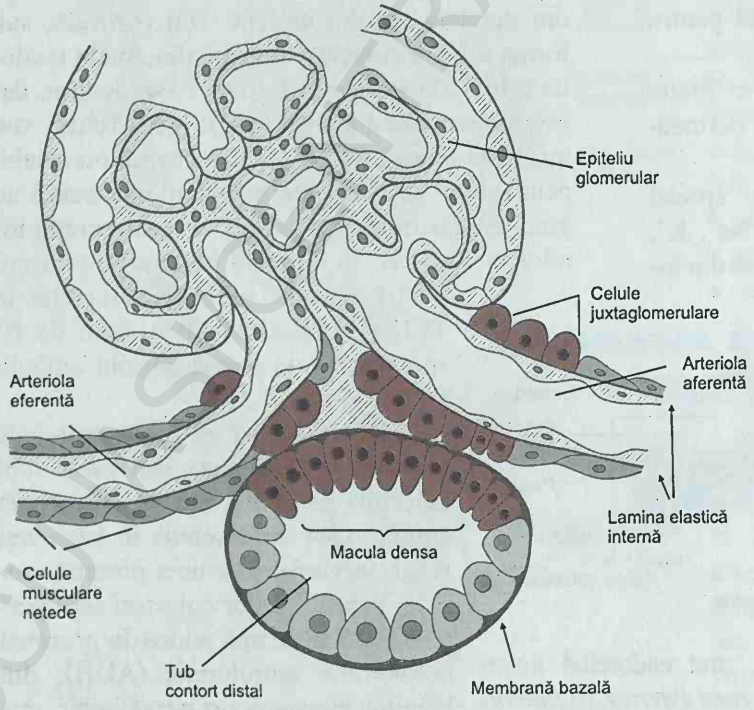


Figura 20.3. Aparatul juxtaglomerular renal

20.1.4 Sistemul vascular renal

Artera renală se ramifică în hilul renal în artere destinate fiecărei zone a rinichiului: artere polare superioare, artere centrale și artere polare inferioare. În parenchimul renal, aceste artere trec printre piramidele renale (lobi renali), fiind denumite *artere interlobare*. La baza piramidei și la joncțiunea medularei cu corticala se formează *arterele arciforme* ce dau naștere *arterelor interlobulare*, care străpung corticala. Fiecare arteră interlobulară generează *vasul aferent*, care printr-o primă capilarizare formează câte un glomerul renal, învelit de capsula epitelială a lui Bowman. *Vasul eferent*, emergent din glomerul, se recapilarizează, formând *vasa recta* din jurul anselor Henle. Venele, adunând sângele acestor vase, prin confluență, formează *venele recta*, *venele arcuate*, *venele interlobare* și în sfârșit, *vena renală*. Rinchii dispun și de o rețea limfatică bogată.

20.1.4.1 Fluxul sanguin renal

Prin cele două artere renale, desprinse direct din aorta abdominală, rinichii au o irigare sanguină abundentă: din debitul cardiac 20% trece în fiecare minut prin rinichi. Acest volum se numește fluxul sanguin renal (FSR).Cunoscând valoarea hematocritului, se poate calcula și fluxul plasmatic renal [FPR = FSR x (1 - hematocrit)], având valoarea normală între 600 - 650 ml/minut. În comparație cu valoarea medie de 65 - 75 mmHg a presiunii sanguine intraarteriale renale, presiunea capilară glomerulară este de 55 - 60 mmHg. Din această valoare trebuie să fie scăzută presiunea intracapsulară renală de 27 - 28 mmHg, rămânând astfel presiunea efectivă de filtrare PEF (presiunea capilară - presiunea intracapsulară) = 28 - 32 mmHg. Datorită autoreglării circulației renale, valoarea presiunii efective de filtrare rămâne constantă în ciuda variațiilor însemnate (între 60 - 150 mmHg) ale presiunii arteriale sistemice. Scăderea presiunii

efective de filtrare, manifestată prin tulburarea metabolismului energetic sau scăderea excesivă a presiunii sistemice (colaps, hemoragie), duce la scoaterea din funcție a autoreglării și la oprirea filtrării glomerulare.

Circulația renală medulară: din volumul total al FSR 88 % trec prin stratul cortical și 12 % prin zona medulară, din care 11 % prin cea externă și 1 % prin cea internă. În caz de concentrare a urinei debitul circulației medulare scade, în cazul diluției, crește. În aprecierea epurației renale, din valoarea fluxului sanguin și plasmatic trebuie scăzută valoarea debitului circulației medulare.

Consumul de oxigen al rinichilor este însemnat (15 - 20 mmol/min, ceea ce reprezintă 5 - 8 % din consumul total de oxigen al organismului), deși diferența presiunii parțiale (pO_2) a oxigenului între sângele arterei și venei renale este de numai 1 - 2 %.

20.1.4.2 Reglarea fluxului sanguin renal

Fluxul sanguin renal este responsabil de filtrarea și excreția unor produși finali de metabolism (ca ureea și creatinina), de adaptarea rapidă a excreției de apă și electroliți în funcție de aportul acestora și de compoziția organismului, servește ca rezervă funcțională hemodinamică (1L/ min) în caz de urgență extremă. În șoc FSR poate fi redus la nivele foarte scăzute cu scopul susținerii fluxului sanguin spre alte organe - cord, creier (dacă însă situația se prelungește, pot rezulta leziuni renale severe). Reglarea fluxului sanguin renal este realizată de factori externi și umorali, precum și de un mecanism intrinsec de autoreglare. Activarea nervilor simpatici renali, descărcarea de adrenalină și noradrenalină vor genera vasoconstricție renală. Hipoxia, anxietatea și schimbările posturale activează reflexul chemoreceptor cu scăderea FSR. De asemenea, barbituricele și anestezicele diminuează FSR.

Autoreglarea intervine la valori ale presiunii arteriale medii situate în intervalul 70-210 mmHg, când FSR și RFG rămân aproape constante, în ciuda variațiilor presionale sanguine. Survine la nivelul arteriolei aferente, printr-un mecanism de feed back tubulo-glomerular declanșat de variațiile cantității de apă și de Na^+ care vin în contact cu componentele aparatului juxtaglomerular (vezi sistemul RAA). Celulele juxtaglomerulare sintetizează și depozitează în citoplasma lor, sub formă de granule, o enzimă proteolitică numită **renină**. În cazul scăderii fluxului sanguin renal sau a conținutului în sodiu al tubului contort distal, renina se eliberează prin degranulare (consecință a scăderii calciului intracelular). Această protează descompune o proteină plasmatică α-2-globulinică (de origine hepatică), numită angiotensinogen, cu eliberarea unui decapeptid, numit angiotensină- I. Aceasta este încă inactivă, dar sub acțiunea unei alte peptidaze produse în plămân, numită angiotensinază sau convertază (Angiotensin Coverting Enzyme, ACE), prin eliberarea proteolitică a doi aminoacizi terminali, se transformă într-un octapeptid, numit **angiotensină-II** (AT II), care este purtătorul de semnal propriu-zis al sistemului osmoreglator.

Acțiunea vasoconstrictoare a angiotensinei-II se manifestă pe de o parte la nivelul pereților arteriolelor eferente (reduce fluxul sanguin renal, menținând filtrarea), ducând la menținerea presiunii arteriale sistemice. Pe de altă parte, stimulează puternic producția de aldosteron în celulele zonei glomerulare a corticosuprarenalei. Nivele plasmatice crescute ale AT II produc o contracție a celulelor mezangiale (ceea ce descrește filtrarea glomerulară) și vasoconstricție generalizată (inclusiv a arteriolelor aferente și eferente), ceea ce menține presiunea arterială centrală, cu sacrificiul fluxului sanguin renal. Vasodilatatoarele (PG, NO și ANP) au efecte contrareglatorii (absența sau blocarea acestora produc hipertensiune și vasoconstricție renală).

20.2 Metabolismul renal

La nivelul rinichiului se desfășoară un metabolism intens. Cea mai mare parte a proceselor metabolice sunt aerobe, consumul de oxigen al rinichiului fiind egal cu acela al miocardului (triplu față de acela al țesutului nervos), în cortexul renal fiind mult mai mare decât în medulară. Cea mai mare parte a activității metabolice este necesară pentru susținerea reabsorbției tubulare – 70% din consumul de oxigen este utilizat pentru transportul activ al sodiului.

20.2.1 Metabolismul energetic

Principalele substrate energetice utilizate în cortexul renal sunt: acizii grași, lactatul, glutamatul, citratul și corpii cetonici.

În celulele renale bogate în mitocondrii, se desfășoară reacțiile ciclului Krebs, iar fosforilarea oxidativă atinge un nivel ridicat. În zona corticală predomină izoenzimele LDH_1 și LDH_2. La nivelul medularei renale are loc glicoliza anaerobă și predomină izoenzimele LDH_4 și LDH_5. Ciclul pentozo-fosfaților este slab reprezentat. La nivelul țesutului renal fosfatazele sunt foarte ac-

tive cu producere de fosfaţi, iar corpii cetonici (β-hidroxibutiratul, acetilacetatul) pot fi utilizaţi, într-o mică măsură, ca substrat energetic.

20.2.2 Metabolismul azotat

Rinichiul este dotat cu sisteme enzimatice de dezaminare oxidativă a aminoacizilor. Prin corelarea acestora cu procesul de transaminare are loc producerea de NH_3, care se elimină prin urină sub formă de NH_4^+. De asemenea, are loc generarea creatininei din creatină, proces care se desfăşoară însă mult mai intens în ficat.

20.3 Funcţiile renale

Deşi nefronul (sistem glomerulotubular) funcţionează ca un tot unitar, se obişnuieşte tratarea separată a funcţiilor glomerulare şi tubulare, precum şi a celor de reglare a presiunii arteriale, a secreţiei de renină şi eritropoietină.

Formarea urinei se realizează în trei etape: filtrarea glomerulară, reabsorbţia tubulară şi secreţia tubulară.

20.3.1 Filtrarea glomerulară

Filtrarea glomerulară este un proces pasiv prin care se realizează ultrafiltrarea plasmei, în raport de prezenţa factorilor determinanţi, ca FSR, respectiv FPR şi PEF. Filtratul glomerular (urina primară) corespunde deci ultrafiltratului plasmei, conţinând totuşi cantităţi reduse de proteine. Urina definitivă este lipsită de proteine (maximum 0,15 g/l = 15 mg/dL), deoarece la nivelul tubilor proximali are loc reabsorbţia proteinelor filtrate. Permeabilitatea glomerulară este selectivă: moleculele cu diametrul <4 nm traversează fără restricţii capilarele glomerulare, iar pentru moleculele cu diametrul > 8 nm filtrarea este blocată. Datorită GM mici, albumina ar putea traversa porii filtrului glomerular, dar fiind încărcată negativ la pH-ul fiziologic, apare fenomenul de respingere electrostatică cu suprafaţa electronegativă a celulelor endoteliale. Celelalte proteine au diametrul prea mare pentru a trece prin membrana filtrantă glomerulară.

Viteza de formare a ultrafiltratului (rata filtrării glomerulare - RFG) este de 125 ml/min, reprezentând 15-20% din fluxul plasmatic renal. Zilnic se filtrează prin glomerulii renali aproximativ 180-200 l apă şi substanţe dizolvate cu greutate moleculară mică (GM < 68.000 D). Producţia zilnică de urină însă, este de numai 1-2 l. Extracţia unei substanţe din plasmă poate varia între 0 şi 100 %, ceea ce corespunde valorilor gradului de extracţie între 0 şi 1. Aceste valori sunt exprimate în practica medicală prin volumul virtual de plasmă epurată de o substanţă oarecare, într-un minut (*Clearance*):

$$C = \frac{U \cdot V}{P} \text{ mL/min, unde}$$

C-volumul de plasmă epurată în 1 minut;
P-concentraţia în plasmă a substanţei;
V-volumul urinar/minut;
U-concentraţia în urină a substanţei.

În cazul unei substanţe care se filtrează în glomeruli, dar nu se reabsoarbe în tubi (creatinina endogenă sau inulina exogenă), valoarea normală a coeficientului de epurație variază între 60 - 125 ml/min, valori mai scăzute înregistrându-se la persoanele vârstnice. Dacă Clearance-ul este foarte scăzut (sub 10 ml/min), la persoanele cu disfuncţii renale severe, creatinina se secretă semnificativ la nivelul tubilor uriniferi, astfel încât clearance-ul este supraestimat prin formula clasică. Pentru substanţele, care se reabsorb parţial (ureea), valoarea este mai mică (60 - 80 ml/min), pentru cele care se reabsorb în întregime (glucoza), este egală cu 0, iar cele care se filtrează, dar se şi elimină din sânge prin secreţie tubulară (acidul para-amino hipuric = PAH), prezintă o valoare de clearance foarte mare (700 - 800 ml/min).

20.3.2 Funcţiile tubulare

20.3.2.1 Reabsorbţia tubulară

Se poate realiza prin transport transcelular sau paracelular prin spaţiul dintre celulele tubulare (prin difuziune pasivă sau prin atragerea solventului).

Transporturile pasive tubulare au loc în sensul şi pe seama gradienţilor de concentraţie.

Transporturile active sunt cel mai adesea limitate, având o capacitate maximă (Tm): tipul glucozei (*Figura 20.4*) şi de asemenea al aminoacizilor şi proteinelor.

Substanţa de transportat se uneşte cu un transportor membranar („*carrier*") pe faţa luminală a celulelor tubulare, de care se decuplează după pătrunderea substanţei în celule. Apoi, substanţa trece din celulele tubulare în capilarele peritubulare, iar transportorul revine la suprafaţa luminală. În mod normal, Tm este de 2-3 ori mai mare decât concentraţia substanţei în ultrafiltratul glomerular. Tm este independent însă de concentraţia substanţei aflate în ultrafiltratul glomeru-

lar. În cazul în care filtratul glomerular nu conține cantități excesive ale substanțelor respective, care să depășească capacitatea maximă a transportului tubular (Tm), urina definitivă va fi lipsită de acestea. În cazul unei filtrări glomerulare excesive, capacitatea Tm este depășită și substanțele apar în urină (de exemplu glucozuria în caz de hiperglicemie persistentă peste 180 mg%). În condiții normale, glucoza din urina primară este reabsorbită activ în prima porțiune a TCP. Glucoza, fructoza, galactoza sunt transportate printr-un *„carrier"* ce posedă pentru toate un singur locus de fixare (glucoza având afinitate maximă) și un locus pentru fixarea Na^+. Transportul are loc numai când ambele situsuri sunt ocupate, de aceea se numește *cotransport* sau *simport*. Astfel, glucoza este transferată activ în celulele epiteliale ale TCP. De aici, glucoza traversează, prin difuziune facilitată, membrana bazo-laterală unde se află ATP-aza Na^+/K^+ dependentă și pătrunde în spațiile intercelulare și, în final în plasmă.

Aminoacizii sunt resorbiți activ în TCP, unii aproape total, iar alții numai într-o proporție ridicată (cistina, lizina, histidina). Transportul aminoacizilor la nivelul marginii în perie a nefrocitelor proximale este realizat de un sistem transportor stereospecific saturabil, dependent de gradientul electrochimic de Na^+ lumen-celulă. În condiții normale, excreția urinară a aminoacizilor este foarte scăzută.

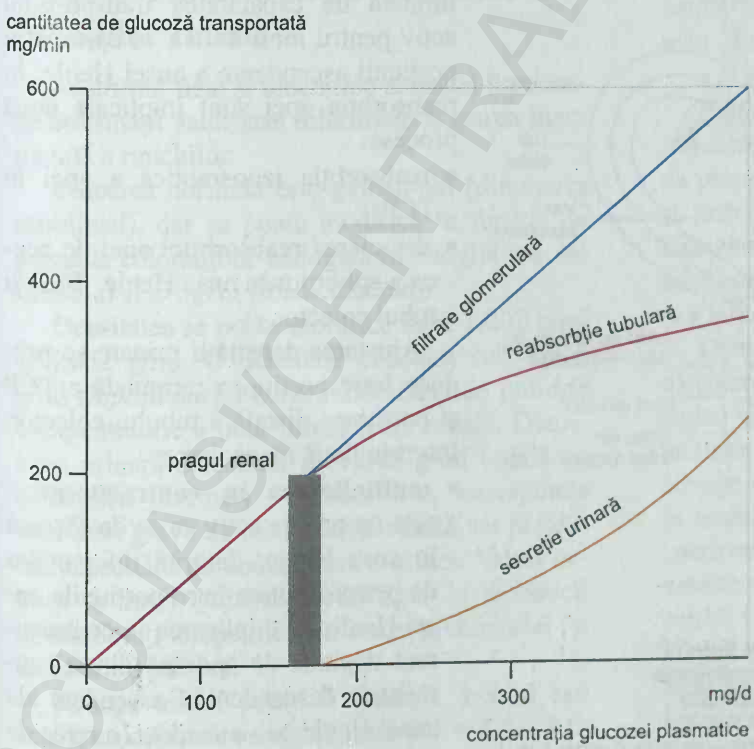


Figura 20.4. Filtrarea și reabsorbția glucozei la nivel renal

20.3.2.2 Secreția tubulară

Reprezintă capacitatea celulelor tubulare renale de a sintetiza/secreta substanțe care, fie nu există în urina primară, fie sunt într-o concentrație mai mică decât în urina finală (ex. PAH, penicilina, ionii de K^+, H^+). Celulele epiteliale tubulare pot extrage din plasmă și secreta în urină diferite substanțe, ca acidul paraaminohipuric (PAH). Capacitatea de secreție a epiteliului tubular este saturabilă. Cantitatea filtrată a substanței administrate intravenos corespunde valorii coeficientului de epurație (120 mL/min). Cantitatea excretată însă este mult mai mare și poate fi calculată din suma cantităților filtrate și secretate. Cantitatea secretată la început crește liniar cu creșterea concentrației plasmatice, însă numai până la o anumită cantitate limită, de 100 mg/L PAH. Acest nivel al concentrației plasmatice de PAH se numește limita de autodeprimare (Self Depression Limit, SDL). La valori și mai mari, capacitatea secretorie se saturează, manifestându-se limita de saturație (Saturation Limit, SL), după care măsura epurației PAH corespunde coeficientului de epurație. În condiții fiziologice, valoarea coeficientului de epurație (clearance-ul) a PAH se modifică între 700 - 800 mL/min.

20.3.2.3 Difuziunea neionică

Din cauza compoziției lor lipidice, membranele celulare sunt impermeabile pentru apă și ioni. Totuși electroliții slabi, sub forma lor neionizată (apolară), pot traversa membranele celulare fără nici o dificultate. Astfel, amoniacul (NH_3) format în celulele tubulare, prin dezaminarea aminoacizilor, trece prin difuziune neionică în lumenul tubular, unde fixează un proton (H^+) și se transformă în cation amoniu NH_4^+. Sub această formă poate neutraliza acizi (acidul uric, oxalic), participând la menținerea echilibrului acido-bazic, dar nu se poate reîntoarce în celule. În mod similar, în cazul unei intoxicații cu barbiturați, acidul barbituric filtrat în urina acidă nu se poate disocia electrolitic și (prin difuziune neionică) se reabsoarbe în sânge. În urma alcalinizării urinei

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARA

(prin perfuzia bicarbonaților), acidul barbituric disociază electrolitic, sub această formă ionică nu se reabsoarbe și se elimină rapid din organism prin urină.

20.3.3 Mecanismele funcției glomerulo-tubulare de concentrare și de diluare a urinei

Volumul filtratului glomerular este de 180 L în 24 de ore, conținând printre altele 26 moli Na^+, 19 moli Cl^- și având osmolaritatea plasmei. În schimb, urina definitivă are un volum de 1,5 L, conține numai 0,23 moli Na^+ și 0,19 moli Cl^- și are osmolaritatea între 650 și 1.200 mosmol/L, respectiv densitatea între 1,002 – 1,030 g/mL. Reiese că prin contribuția sistemului tubular, cantitățile de apă și de electroliți filtrate suferă modificări substanțiale. Activitatea de concentrare sau de diluție a rinichilor poate fi explorată pe baza valorii coeficientului de epurație al apei. În cazul în care valoarea osmolarității urinei (Uosm) este egală cu valoarea osmolarității plasmei (Posm), coeficientul de epurație (clearance) al apei este egal cu zero ($C_{apă} = 0$). În cazul, în care valoarea Uosm depășește valoarea Posm, valoarea $C_{apă}$ devine negativă, ceea ce înseamnă o retenție de apă, adică concentrarea urinei. În caz de diluare a urinei valoarea Uosm devine inferioară valorii Posm, valoarea $C_{apă}$ devenind pozitivă - eliminare renală în exces a apei.

La nivelul TCP, din conținutul total în apă și substanțe filtrate în glomeruli, se reabsorb în mod obligatoriu aproximativ 70 %. Reabsorbția ionilor are loc în condiții izoosmotice, urmată de reabsorbția pasivă a apei. Ca urmare, în această porțiune tubulară, urina primară rămâne izoosmotică. În segmentul descendent al ansei Henle se reabsoarbe pasiv apa. În porțiunea ascendentă a ansei Henle, celulele epiteliale transportă activ ionii de Na^+ din lumen în interstițiu, urmați în mod pasiv de Cl^-. Prin aceasta, țesutul interstițial din jur devine hiperosmotic, iar urina din lumen - hipoosmotică. Celulele epiteliale ale tubilor contorți distali, răspund la acțiunea aldosteronului, prin reabsorbția sodiului și a clorurilor și prin eliminarea potasiului. La acest nivel se manifestă și schimburile ionice între Na^+ și H^+. În prezența ADH, pereții tubilor colectori devin permeabili pentru apă (care, din cauza gradientului de concentrație existent între lumen și interstițiu) pătrunde rapid în țesutul renal hiperosmotic din jur. Astfel urina definitivă devine mai concentrată. Vârful osmotic reprezintă acea valoare maximă (1.500 mosmol/L) a osmolarității urinei, la care poate fi concentrată urina în comparație cu plasma (300 mosmol/L). Valoarea vârfului osmotic este limitată de capacitatea transportului activ pentru ionii de Na^+ al epiteliului porțiunii ascendente a ansei Henle. În reabsorbția apei sunt implicate două procese:

- reabsorbția izoosmotică a apei în TCP;
- disocierea reabsorbției apei de aceea a solviților în ansa Henle, TCD și tubul colector.

Ajustarea densității urinare se produce între porțiunea terminală a TCP și porțiunea distală a tubului colector. Intervin două mecanisme:

- **multiplicarea în contracurent** – este un proces activ ce se desfășoară în ansa Henle, datorită diferențelor de permeabilitate între porțiunile ansei Henle. Multiplicarea în contracurent depinde de apoziția dintre segmentele descendent și ascendent ale ansei Henle cu *vasa recta* (o rețea de capilare derivate din arteriola eferen-

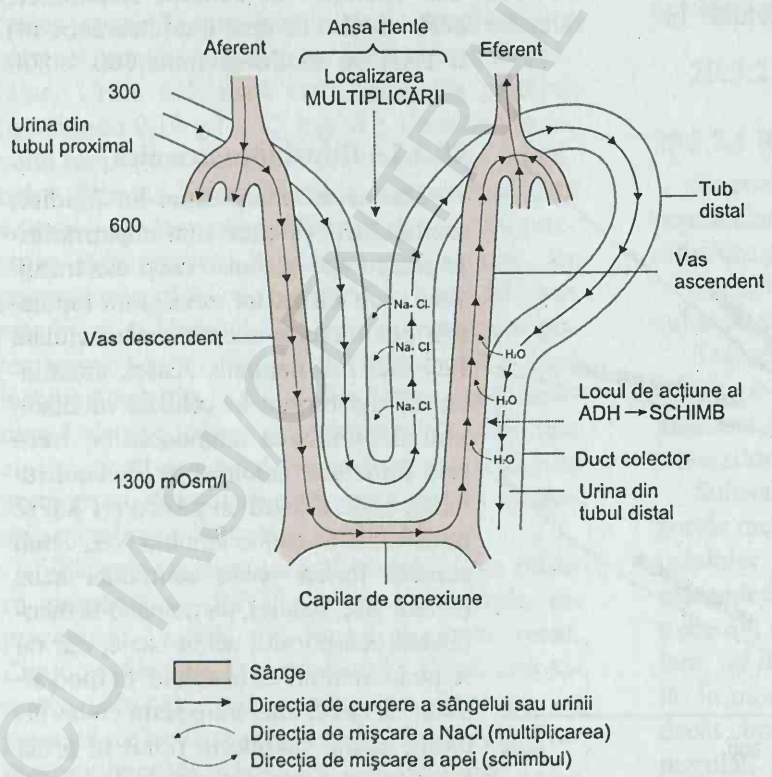


Figura 20.5. Mecanismul în contracurent – relația dintre tubii renali și *vasa recta*

tă, care ajung profund în medulară). La intrarea în segmentul descendent al ansei Henle, fluidul este izoosmolar (300 mmol/L), va deveni aici hiperosmolar, iar în cel ascendent – hipoosmolar. Ureea are acțiune osmotică în interstițiul medular și poate potența multiplicarea în contracurent. Ductele colectoare sunt permeabile pentru uree, aceasta pătrunzând în profunzimea medularei, crescând astfel osmolaritatea interstițiului.

- **schimbul în contracurent** – este un proces pasiv ce se desfășoară numai în prezența ADH-ului. Apa fără solviți este reabsorbită din ductul colector în *vasa recta* ascendentă, în sensul gradientului osmotic creeat de multiplicarea în contracurent și de osmolaritatea crescută din medulară (*Figura 20.5*). Schimbul în contracurent este esențial alături de multiplicare pentru concentrarea urinei. În prezența ADH-ului crește proporțional permeabilitatea pentru apă a celulelor din TCD și colector.

Capacitatea de concentrare a rinichilor este dependentă de următoarele condiții:

- Rata filtrării glomerulare (cantitatea filtrată de apă și de substanțe) să fie suficient de mare;
- Circulația medulară renală să fie optimă;
- Funcția de transport activ a Na^+ în porțiunea ascendentă a ansei Henle, să fie intactă.

20.4. Explorarea de laborator a funcțiilor renale

Examenul fizic și biochimic al urinei furnizează informații valoroase referitoare la starea funcțională a rinichilor.

Culoarea normală este galben-pai (din cauza urobilinei), dar se poate modifica în funcție de prezența coloranților endogeni (hemoglobina, bilirubina) și exogeni (medicamente).

Densitatea se poate modifica între 1,002 g/ml și 1,032 g/ml. O densitate constant sub 1,010 g/ml (*hipostenurie)* corespunde fazei de poliurie compensatorie a unei insuficiențe renale. Densitatea urinară constantă de 1,010 g/ml (egală cu densitatea plasmei) – *izostenurie*, corespunde unei stări grave de insuficiență renală, cu pierderea capacității de concentrare a urinei. Valori extrem de mari (*hiperstenurie)* apar la diabeticii neechilibrați terapeutic, din cauza glucozuriei (și cetonuriei) masive.

Reacția urinei poate fi alcalină, neutră sau acidă, cu aciditatea actuală între pH = 4,5 – 8,5. În condiții normale, într-o perioadă de 24 de ore, se elimină prin urină maximum 50 mmol acizi (aciditate titrabilă). În acidoze sau alcaloze metabolice, aciditatea sau alcalinitatea titrabilă a urinei poate prezenta valori de 5 - 10 ori mai mari.

20.4.1 Explorarea irigației renale

Metoda de rutină este determinarea *clearance-ul acidului para-amino hipuric (PAH).* PAH administrat intravenos sau *per os* este eliminat în totalitate la un singur pasaj renal, coeficientul lui de epurație fiind egal cu fluxul plasmatic renal. Valoarea normală a clearance-ului PAH este 700-800 ml/min. Se mai poate utiliza *clearance-ul acidului 5 hidroxi-indolacetic.*

20.4.2 Explorarea filtrării glomerulare

20.4.2.1 Rata filtrării glomerulare (RFG)

RFG este de 120-150 mL/min la tineri și de 60-80 mL/min la vârstnici. RFG înregistrează o regresie fiziologică odată cu înaintarea în vârstă (scade cu aproximativ 6,5 mL/min/ 1,73m^2 / decadă de vârstă), procesul fiind mai exprimat la bărbați. RFG se determină prin măsurarea excreției unei substanțe filtrate liber la nivel glomerular și care nu se reabsoarbe, nici nu se secretă la nivelul tubilor uriniferi. RFG depinde de:

- dimensiunea și permeabilitatea capilară;
- gradientul de presiune hidrostatică și oncotică între capilarul glomerular - capsula Bowman - tubul urinifer;
- existența unor afecțiuni renale.

Explorarea de rutină a RFG se face determinând *clearance-ul creatininei endogene.* Creatinina plasmatică este produsul metabolic al creatinei și fosfocreatinei, ambele prezente aproape în exclusivitate în mușchi. De aceea, nivelul creatininemiei este corelat cu masa musculară, care la rândul ei e influențată de sex, vârstă și alimentație.

Determinarea clearance-ului creatininei implică colectarea urinei pe 24 de ore; nu este un procedeu simplu de realizat: unii pacienți pot uita să includă unele eșantioane de urină sau chiar să adauge apă sau urină provenită de la alți pacienți în intenția de a impresiona cadrele medicale prin „performanță". După 24 de ore se omogenizează amestecul și se determină creatinina urinară și cea serică. Când RFG scade foarte mult va crește creatinina serică și creatinina este secretată activ de tubii renali, de aceea clearance-ul va indica o valoare mai mare decât RFG reală. Astfel, în insuficiența renală cronică cu RFG < 10 mL/min, clea-

rance-ul creatininei nu mai reflectă corect RFG, ci o supraestimează. De aceea, la acești pacienți se recomandă utilizarea *clearance-ului unor izotopi (Cr^{51} EDTA)* sau clearance-ul altor markeri specifici (*Inulină, Manitol*).

Dintre metodele speciale de determinare a RFG menționăm *clearance-ul inulinei* (standardul de aur pentru aprecierea RFG). Inulina este un polimer al fructozei care nu se metabolizează renal. Metoda nu poate fi aplicată pacienților cu transplant renal.

Datorită dificultăților de colectare a urinei de 24 de ore și a valorii aproximative a parametrului obținut la recoltarea de 3 ore a urinei, se utilizează adesea formule de calcul pentru a estima RFG (RFGe), pe baza unei singure determinări de concentrație serică a creatininei, cu corecții pentru vârstă și masă corporală (Formula Cockcroft-Gault):

$$C = \frac{[140 - \text{vârsta(ani)}] \times \text{greutatea(kg)}}{72 \times \text{creatinina} \cdot \text{serică} \cdot (\text{mg\%})} \times (la \cdot femei) \cdot 0{,}85$$

Pentru femei se consideră o masă musculară cu 15% mai redusă la aceeași vârstă și greutate.

Includerea masei corporale în formulă, ca măsură a masei musculare, constituie un element problematic la persoanele obeze sau cu edeme. La acestea, formula trebuie corectată pentru suprafața corporală, prin înmulțire cu 1,73 și apoi divizare la suprafața corporală calculată pentru persoana în cauză (→ RFGe, ml/min/1,73m^2).

În conformitate cu recomandările CDC, se poate utiliza o formulă mai simplă (în care greutatea nu este inclusă), rezultată din studiul MDRD (Modification of Diet in Renal Disease):

$$RFGe = 186 \times Cr \cdot serica^{-1.154} \times ani^{-0.203} \times (la \cdot femei) \cdot 0{,}742$$

Datorită faptului că utilizarea tehnicii Jaffe pentru determinarea creatininei în ser și urină (foarte răspândită în laboratoarele medicale) are un mic bias analitic pozitiv (deviație de la valoarea reală), comparând această tehnică cu tehnica IDMS (Isotope-Dilution Mass Spectrometry) s-a propus înlocuirea în formula de mai sus, a factorului 186 cu 175.

Creatinina este produsă în organism din fosfocreatina musculară și are proprietăți apropiate de ale inulinei. Totuși la o RFG normală, aproximativ 10% din creatinina excretată este secretată. Datorită limitelor practice de dozare, concentrația serică a creatininei măsurate este cu aproximativ 10% mai mare decât concentrația reală, astfel încât cele două aspecte se compensează și C creatinină = C inulină la subiecții sănătoși.

Având în vedere faptul că disfuncția renală cronică este o problemă de sănătate publică (afectând aproximativ 10% din populația generală și în 80-90% din cazuri, fiind asimptomatică inițial), pentru creșterea șansei de identificare a persoanelor cu disfuncție renală silențioasă s-a propus recent estimarea RFG pentru toate persoanele cărora li se determină concentrația creatininei serice. Prezența unei RFGe < 60 ml/min/1,73 m^2 pentru o perioadă mai lungă de 3 luni, indică în general o afectare renală cronică.

Concentrația plasmatică a ureei variază de asemenea invers cu RFG (uremia, azotemia). Totuși uremia poate crește și datorită reabsorbției tubulare excesive a ureei (ca în deshidratări, rezultând un raport crescut Uree/Cr, tipic pentru azotemia prerenală) sau datorită excesului de proteine în dietă. La pacienți cu afecțiuni hepatice sau anorexie, ureea poate rămâne scăzută sau normală în ciuda unei RFG reduse.

20.4.2.2 Creatinina plasmatică

În formula clearance-ul creatininei, RFG este invers proporțională cu concentrația plasmatică de creatinină. O valoare normală a concentrației creatininei plasmatice nu implică în mod necesar o funcție renală normală, în timp ce creatininemia crescută indică de obicei, afectarea funcției renale (*Figura 20.6*). Dar modificarea concentrației plasmatice a creatininei se poate produce și independent de funcția renală (ex. modificarea masei musculare).

20.4.2.3 Ureea plasmatică

Ureea este produsul final al metabolismului proteic (reprezintă aproximativ 75% din azotul nonproteic excretat de organism) și se sintetizează în ficat. Aproximativ 90% din ureea produsă în ficat este eliminată prin urină, fără alte transformări și reprezintă o rută majoră pentru excreția azotului. Datorită faptului că 50-60% din ureea filtrată glomerular se reabsoarbe pasiv la nivelul tubilor uriniferi, RFG este subestimată cu această substanță. Nivelul ureei plasmatice depinde de alimentație (dieta bogată în proteine), rata catabolismului și de funcția hepatică. Ureea este difuzibilă prin membranele celulare. Excreția urinară depinde de RFG și reabsorbția tubulară.

Afecțiuni ce determină hiperuremie:

a) prerenale:

- hemoragiile gastro-intestinale;
- statusul hipercatabolic (traumatisme, arsuri, intervenții chirurgicale);
- hipertiroidismul, sindromul Cushing;
- scăderea perfuziei renale (insuficiența cardiacă, stenoza arterei renale, scăderea volemiei);

b) renale: glomerulonefrite acute, cronice, pielonefrite, necroza tubulară acută;

c) postrenale: obstrucția tractului urinar (litiază, tumori).

Deși, concentrația serică de creatinină și uree se măsoară deseori simultan, creatinina reflectă mult mai fidel funcția glomerulară, deoarece ureea este afectată în mare măsură de factori extrarenali. Ureea este utilă mai ales pentru depistarea altor probleme clinice asociate disfuncției renale (ex. dieta bogată în proteine, hemoragiile digestive, statusul hipercatabolic). Nivelul plasmatic al ureei se corelează mai bine cu simptomatologia *„uremică"* și reflectă aportul de proteine (factor important care trebuie monitorizat la bolnavii cu insuficiență renală cronică).

Deseori se utilizează raportul uree serică (mg/dL) / Creatinină serică (mg/dL), valoarea normală a acestui raport pentru persoane sănătoase cu o dietă normală, fiind între 26 și 43. Raport semnificativ scăzut indică necroze tubulare acute, boală hepatică gravă sau aport alimentar de proteine foarte scăzut. Raport crescut cu valori normale ale creatininei serice, indică azotemie prerenală (leziuni tisulare, aport proteic crescut). Raport crescut cu valori crescute ale creatininei serice, indică de obicei o obstrucție postrenală, sau azotemie prerenală asociată cu afectare renală.

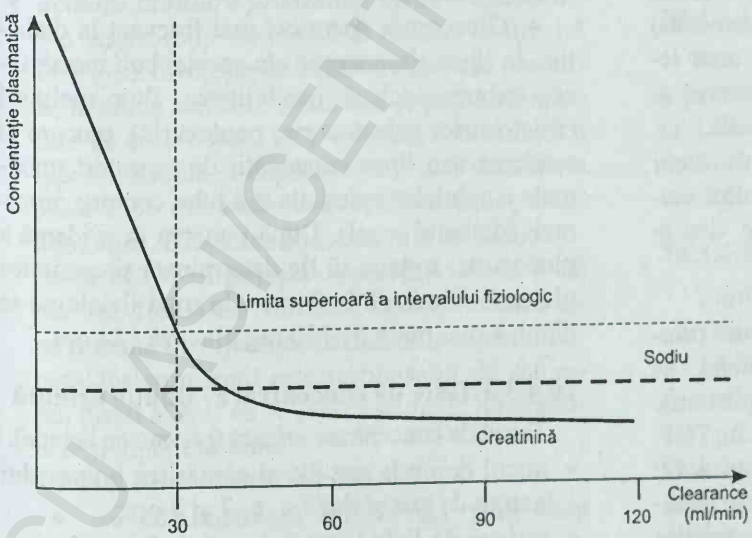


Figura 20.6. Relația dintre clearance-ul și concentrația plasmatică a creatininei

20.4.2.4 Cistatina C

Este o protează cisteinică cu greutatea moleculară de 13 kDa, produsă în condiții fiziologice cu o rată constantă de toate celulele nucleate, filtrată aproape complet la nivelul glomerulului renal și masiv catabolizată de către celulele tubulare renale proximale. Din momentul demonstrării corelației dintre concentrația serică a acestei proteine și RFG, a fost introdusă ca un marker de screening al funcției renale. Este recomandată în special la copii, la care, spre deosebire de concentrația serică a creatininei (al cărei bias pozitiv este chiar mai accentuat la valorile mici de concentrație), are capacitatea de a reflecta funcția glomerulară independent de vârstă, sex, înălțime și compoziție corporală. Terapia cu glucocorticoizi, disfuncțiile tiroidiene și dezvoltarea unor tumori, pot influența concentrația serică a Cistatinei C, a cărei concentrație fiziologică nu depășește 1,2 mg/L. Pentru monitorizarea funcției renale la pacienții cu boală renală confirmată, se preferă însă în continuare Clearance-ul de creatinină.

20.4.3 Explorarea funcției tubulare

20.4.3.1 Excreția urinară a aminoacizilor

Poate fi investigată prin metode cromatografice. Cauzele apariției în urină a aminoacizilor:

- deficiență generalizată (globală) a transportului tubular (sindromul Fanconi);
- deficiență selectivă (izolată) a transportului tubular al unor aminoacizi (cistinuria);
- creșterea concentrației plasmatice a aminoacizilor cu depășirea (saturarea) mecanismului de transport tubular.
- Clasificarea aminoaciduriilor patologice:
- în funcție de etiologie, pot fi congenitale sau dobândite;
- după gradul de interesare al unui singur aminoacid sau al unor grupuri de aminoacizi, aminoaciduriile sunt izolate sau globale;
- după mecanismul fiziopatologic se disting:

- *aminoacidurii renale* – cu afectarea reabsorbţiei aminoacizilor din TCP, concentraţia plasmatică a aminoacizilor fiind normală;
- *aminoacidurii prerenale* – defectul primar nu este de natură renală, de cele mai multe ori fiind implicate tulburări congenitale ale metabolismului aminoacizilor. În acest caz, concentraţiile sanguine şi urinare ale aminoacizilor sunt crescute.

a) Aminoaciduriile prerenale izolate (congenitale) se datorează unor deficienţe de sinteză a unei enzime dintr-o cale metabolică, cu acumularea consecutivă a substanţei care este substrat în reacţia catalizată de enzima deficitară.

- ***Boala urinilor „cu miros de arţar"*** apare datorită unei deficienţe în decarboxilarea oxidativă a aminoacizilor cu catenă apolară ramificată (valina, leucina, izoleucina), care se elimină sub formă de α-cetoacizi, ce imprimă urinei mirosul caracteristic aromat. Din punct de vedere clinic se caracterizează prin retard mental.
- ***Alcaptonuria*** se datorează unei deficienţe a *homogentizin oxidazei*, care se soldează cu acumularea acidului homogentizinic (Alcapton) în ţesutul conjunctiv, tegumente şi mucoase, generând dureri artritice, fotosensibilitate şi urini de culoare închisă. Manifestările clinice debutează de obicei, după 30-40 de ani.
- ***Fenilcetonuria*** este consecutivă deficitului de *fenilalanin hidroxilază* (FAH) hepatică (forma clasică se datorează unor mutaţii ale genei localizate pe cromozomul 12), cu acumularea în organism a fenilalaninei şi creşterea concentraţiei sale plasmatice. Analiza ADN a genei FAH, a arătat peste 100 de mutaţii (inserţii, deleţii, non-sens) până în prezent. Consecinţa este apariţia unor leziuni ireversibile la nivelul sistemului nervos şi deficienţe în dezvoltarea fizică şi intelectuală.
- ***Albinismul*** este generat de deficitul *tirozin oxidazei* din calea de obţinere a pigmentului melanic, manifestându-se clinic prin pete depigmentate pe tegument, păr alb.

b) Aminoacidurii renale globale

- ***Sindromul Toni – Debre - Fanconi (diabetul renal gluco – fosfo - aminoaciduric)*** se caracterizează prin pierderi urinare de substanţe a căror reabsorbţie ar trebui să aibă loc în TCP. Elementele esenţiale ale acestui sindrom sunt: glucozurie normoglicemică, aminoacidurie generalizată cu concentraţie normală a aminoacizilor plasmatici, hiperfosfaturie cu fosfatemie scăzută asociate cu rahitism vitamino-D rezistent sau osteomalacie, fosfataza alcalină crescută. De asemenea, se însoţeşte de acidoză tubulară proximală de tip II şi poliurie vasopresino- rezistentă.

c) Aminoacidurii renale izolate (familiale)

- ***Boala Hartnup*** – se transmite autozomal recesiv şi se caracterizează prin deficit de reabsorbţie tubulară şi intestinală a aminoacizilor monoaminomonocarboxilici (Ala, Ser, Thr, Asn, Phe, Val, Leu, Ile, His, Trp). Pierderea Trp va genera deficit de vitamina PP (factorul pelagropreventiv). Clinic se înregistrează ataxie cerebeloasă şi pelagră (cu simptomatologia celor trei D: dermatită, demenţă, diaree).
- ***Boala Joseph*** – se datorează unui deficit de reabsorbţie tubulară a prolinei şi a hidroxi prolinei.
- ***Cistinuria*** – este o boală congenitală cu transmitere autozomal recesivă caracterizată prin deficit de reabsorbţie a aminoacizilor dibazici din TCP şi mucoasa jejunală. Manifestările clinice sunt reprezentate de litiaza renală cistinică şi complicaţiile ei: uropatie obstructivă, pielonefrita cronică şi insuficienţa renală cronică. Apare în decadele a 2-a şi a 4-a de viaţă. Calculii de cistină conţin sulf, sunt denşi şi radioopaci.

20.4.3.2 Excreţia urinară a glucozei

Glucoza apare în urină în următoarele situaţii:

- concentraţia glucozei plasmatice creşte cu depăşirea capacităţii de reabsorbţie tubulară;
- scăderea capacităţii de reabsorbţie tubulară (în sarcină, de exemplu);
- defect de transport tubular al glucozei (sindromul Fanconi).
- Glucozuria apare cel mai frecvent la diabetici. În lipsa altor semne ale acestei boli metabolice, trebuie exclusă posibilitatea altor meliturii (fructozurie, galactozurie, pentozurie), precum şi scăderea sau lipsa capacităţii de transport maximale a celulelor epiteliale din tubii contorţi proximali (diabetul renal). După punerea în evidenţă a glucozuriei trebuie să fie determinată şi cantitatea glucozei eliminate în 24 ore. În mod fiziologic se elimină mai puţin de 150 mg glucoză / 24 ore.

20.4.3.3 Teste de concentrare / diluţie urinară

Testul de concentrare urinară (privare de lichide):

- micul dejun la ora 8½ şi cântărirea bolnavului înainte de test şi după 4, 6, 7 şi 8 ore;
- privare de lichide pe o durată de 8 ore, perioadă în care nu se fumează;

- se recoltează urina din oră în oră și se determină volumul urinar și osmolaritatea urinară;
- se recoltează sânge pentru determinarea osmolarității la ½ intervalului pentru fiecare recoltare urinară;
- după 8 ore se administrează apă *per os* și 2μg Desmopresină (derivat de vasopresină) intramuscular;
- se recoltează urina timp de 2 ore, din 30 în 30 minute.

Interpretarea testului: în mod normal, la o osmolaritate plasmatică de 300 mOsm se obține o osmolaritate urinară de aproximativ 600 mOsm. În diabetul insipid, osmolaritatea plasmatică crește, iar osmolaritatea urinară scade (osmolaritatea urinară fiind inferioară celei plasmatice). După administrarea hormonului (la 8 ore de la începerea testului) situația se remediază în cazul diabetului insipid central. Diabetul insipid nefrogen nu răspunde la vasopresină.

20.4.3.4 Teste de acidifiere urinară

În menținerea echilibrului acido-bazic sunt esențiale eliminarea ionilor de H^+ și reabsorbția/ neoformarea HCO_3^-.

Acidoza tubulară renală este de două tipuri:

- ***acidoza tubulară distală tip I*** – caracterizată prin incapacitatea nefronului distal de a secreta ionii H^+ astfel încât pH-ul urinar nu scade sub 5,5 în pofida acidemiei sistemice. Este o acidoză metabolică hipercloremică și hipopotasemică. Manifestările clinice sunt cele ale acidozei, hipopotasemiei și nefrocalcinozei sau litiazei renale.
- ***acidoza tubulară proximală tip II*** – constă într-o reabsorbție deficitară a HCO_3^- la nivelul TCP și se însoțește de urini cu aciditate normală, în ciuda acidozei sistemice și pierderii marcate de bicarbonat. Este o acidoză metabolică hipercloremică și hipopotasemică. Pierderea a peste 15% din bicarbonatul filtrat este patognomonică. Creșterea concentrației bicarbonatului în TCD se însoțește de pierdere urinară de Na^+ sub formă de $NaHCO_3$, care generează hipovolemie cu hiperaldosteronism secundar. Hiperaldosteronismul este responsabil de schimbul distal al Na^+ cu K^+, cu apariția de hiperkaliurie și hipopotasemie.

Testul de acidifiere cu NH_4Cl:

- se administrează NH_4Cl 0,1 g/kg corp *per os* pentru inducerea acidozei metabolice (nu este necesară această administrare dacă bolnavul se află deja în acidoză metabolică);
- se verifică CO_2 total plasmatic ($=HCO_3^- + CO_2 + H_2CO_3$)-rezerva alcalină, care trebuie să scadă cu cel puțin 4 mmol/L (dacă s-a indus acidoza metabolică);
- se recoltează urina din oră în oră timp de 6 – 8 ore, cu verificarea pH-ului urinar.

Interpretarea testului: - pH-ul urinar ≤5,3 semnifică eliminare normală de ioni de H^+, dar poate indica o acidoză tubulară renală proximală (tip II). Un pH urinar > 6 se asociază cu acidoza tubulară renală distală.

20.4.4 Proteinuria

Prin glomeruli se filtrează zilnic 7-10 g proteine, dar marea majoritate a acestei cantități se reabsoarbe prin endocitoză în TCP, astfel încât prin urina definitivă se elimină în mod fiziologic numai 0,03 – 0,20 g proteine/ 24 h, care însă nu pot fi puse în evidență cu ajutorul metodelor uzuale. Aproximativ ½ din această cantitate este reprezentată de glicoproteina Tamm-Horsfall, o glicoproteină secretată de celulele tubulare ale porțiunii groase ascendente a ansei Henle. Celulele tubulare supraviețuiesc în mediul hiperton al medularei renale, prin acumularea lentă a unor substanțe osmotic active (sorbitol și glicerofosfocolină prin sinteză, betaină și inozitol prin cotransport cu Na), care pot fi rapid eliberate atunci când osmolaritatea scade. Albuminuria fiziologică este sub 0,035 g/24 h (microalbuminurie). O proteinurie decelabilă este deci un fenomen patologic, care poate fi de origine prerenală, renală sau postrenală.

20.4.4.1 Proteinuriile prerenale

Pot apare din cauza creșterii marcate a RFG, a proteinemiei peste 100 g/L (depășirea capacității de TmP), în efort fizic, ortostatism, staza renală din cauza trombozei venei renale, mielom multiplu, etc.

20.4.4.2 Proteinuriile renale

Sunt cele mai frecvente și se clasifică în proteinurii glomerulare, tubulare sau mixte.

a) Proteinuria glomerulară variază cantitativ de la 300 mg/zi până la 20 g/zi. Apare de obicei prin creșterea permeabilității glomerulare. Proteinuriile pot fi **selective** (cu prezența proteinelor cu greutăți moleculare mici: albumină - minimum 80%, transferină, α1-glicoproteine și urme de imunoglobuline), **semiselective** (cu depistarea unor fracțiuni intermediare: imunoglo-

bulinele IgG și IgA) și proteinurii **neselective** (cu prezența tuturor fracțiunilor serice, inclusiv a proteinelor cu greutate foarte mare: IgM, β-lipoproteina și α2-macroglobulina). Aceasta din urmă orientează spre leziuni glomerulare severe. Clearance-ul diferitelor proteine indică mult mai precis gradul de selectivitate al leziunii renale. Clearance-ul proteinelor cu GM mică, cum ar fi albumina sau transferina este comparat cu cel al proteinelor cu GM mare. Rezultatul este, de obicei, exprimat sub formă de raport (R). Astfel, **indexul de selectivitate** este definit ca raportul clearance IgG/ clearance Albumină. Un R < 0,2 indică selectivitate mare (se pierd predominant proteine cu GM mică) și are un prognostic mai favorabil decât atunci când raportul are o valoare mai mare.

$$R = \frac{UIgG}{UAlb} \cdot \frac{PAlb}{PIgG};$$

P_{Alb} sau P_{IgG} - concentrația în plasmă a Alb sau IgG;
U_{Alb} sau U_{IgG} - concentrația în urină a Alb sau IgG.

La copii, indexul de selectivitate sub 0,16 are valoare prognostică pentru răspunsul favorabil la steroizi, în cazul nefropatiilor cu leziuni minime.

b) Proteinuria tubulară survine în toate afecțiunile care interesează TCP. Din punct de vedere cantitativ, se situează între 1-2 g/zi. Markeri ai leziunilor tubulare sunt proteinele cu GM mică, cum ar fi β_2-microglobulina, α_1-microglobulina, lizozimul, proteina care leagă retinolul (RBP) și mai recent glicoproteina KIM-1 (Kidney Injury Molecule - 1) - molecula de monitorizare a injuriei renale. Aceste proteine cu GM mică sunt, în mod normal, filtrate glomerular și reabsorbite tubular. Dar β_2-microglobulina este instabilă în urină, de aceea se preferă alte proteine care sunt indicatori mai fideli ai leziunilor tubulare.

β_2-microglobulina plasmatică este un peptid mic (GM 11,8 kDa) și aparține complexului major de histocompatibilitate de clasa I. Este prezentă pe suprafața majorității celulelor nucleate din organism și în concentrație scăzută și în plasmă. Este filtrată de glomeruli, dar reabsorbită și catabolizată de celulele TCP. Concentrația plasmatică de β_2-microglobulină este un bun index al RFG la persoanele sănătoase, nefiind influențată de dietă sau masa musculară. Ea crește în bolile maligne și inflamatorii.

Metodele clasice de determinare a gradului de disfuncție renală acută (concentrațiile serice ale ureei, creatininei, glucozuria, proteinuria, GGT, F Alc) sunt nespecifice și cu sensibilitate scăzută. KIM-1 este o proteină exprimată doar pe membranele apicale ale celulelor tubulare renale proximale, la rinichiul afectat acut. Este o glicoproteină transmembranară de tip 1 cu un ectodomeniu N-terminal mucinic și IgG-like și un domeniu citoplasmatic C-terminal, cu tirozină. Această glicoproteină este un biomarker sensibil și specific al injuriei tubulare renale proximale, ectodomeniul acesteia fiind depistat în urină în concentrații crescute, imediat după survenirea leziunii. Se sugerează că KIM-1 urinară ar putea fi utilizată ca marker surogat în monitorizarea pacientului transplantat renal.

c) Proteinuria mixtă este combinația dintre proteinuria glomerulară și cea tubulară.

Electroforeza dintr-un specimen de urină poate ajuta la diferențierea variatelor tipuri de proteinurie. Se poate detecta proteinuria Bence-Jones; în proteinuria glomerulară sunt prezente în urină proteine cu GM mare (peste 70 kDa), iar în proteinuria tubulară predomină proteine cu GM mică (proteine filtrate, care nu sunt reabsorbite).

20.4.4.3 Proteinuriile postrenale

Apar în urma unor leziuni ale căilor urinare între pielon și uretră. Dat fiind că aceste leziuni se manifestă aproape exclusiv cu hemoragii, proteinuriile postrenale sunt asociate cu hematurie.

20.4.5 Pigmenturia

Hematuria este fie microscopică (hematii prezente în sedimentul urinar), fie macroscopică. La **proba celor trei pahare (proba Guyon)** prin care se recoltează urina la începutul, mijlocul și sfârșitul micțiunii, hematuria poate fi inițială (din zona cervico-prostatică), terminală (din vezica urinară) sau totală (de origine renală sau ureterală). La examenul microscopic, hematiile provenite din leziunile glomerulare sau tubulointerstițiale sunt fragmentate, decolorate, iar eritrocitele cu originea în căile urinare (bazinet, ureter, vezică, uretră, prostată) își păstrează forma și culoarea. Hematuria poate fi izolată sau însoțită de durere, tulburări de micțiune, piurie, proteinurie, cilindrurie, cheaguri etc.

Hemoglobinuria masivă poate fi recunoscută ușor și după aspect. Ea semnifică prezența hemoglobinei libere în urină și este consecința unei hemolize intravasculare. Poate surveni în urma

Figura 20.7. Frecvente celule scuamoase (epiteliale plate sau pavimentoase). MCF x 400

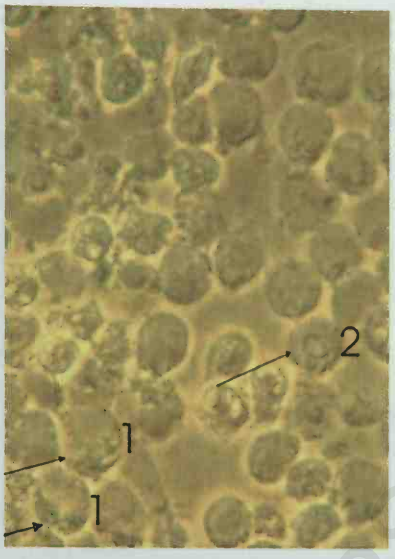


Figura 20.8. Masă de leucocite neutrofile în care se observă două (leucocite) celule Sternheimer-Malbin având citoplasma atomizată, marcate prin săgeți (1), alături de un monocit (2). MO x 640

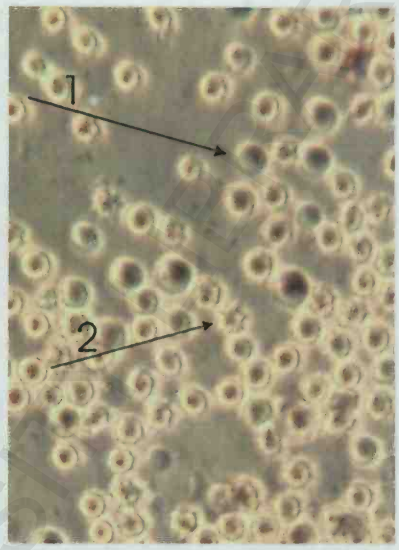


Figura 20.9. Frecvente hematii eumorfe care apar mai îngroşate spre periferie şi mai subțiri spre mijloc (dând un aspect de dublu contur) (1) alături de hematii „în castană" (2). MCF x 640 (colorație Sternheimer - Malbin)

unor infecții, intoxicații, după efort fizic intens ("hemoglobinuria de marş"). După centrifugare urina are culoare roz, roşie sau negricioasă. Se decelează scăderea concentrației plasmatice a haptoglobinei, precum şi hemosiderinuria (celulele tubulare care se descuamează vor conține fier). Aceasta din urmă permite stabilirea diagnosticului retrospectiv de hemoglobinurie.

Mioglobinuria reprezintă prezența mioglobinei în urină; apare în rabdomioliză şi infarct miocardic (necroza şi distrugerea fibrelor musculare). Urina rămâne incoloră după centrifugare. Concentrația serică a haptoglobinei este normală, dar se eliberează în plasmă creatinfosfokinaza, LDH, GOT, aldolaza.

20.4.6 Piuria

Reprezintă prezența în urină a unui mare număr de leucocite, care pot fi alterate şi aglutinate, conferind urinei un aspect tulbure încă de la emisie. Piuria poate fi de origine microbiană cu diverşi germeni (*E. coli, Proteus, Pseudomonas, Klebsiella* etc.) sau amicrobiană (litiaza renală, degenerescența epitelială). Urina palidă, mată, cu pH acid şi uroculturi sterile este sugestivă pentru TBC renală. Piuria putridă, sanguinolentă pledează pentru tumori vezicale maligne.

20.4.7 Sedimentul urinar

Este constituit din elemente organizate şi neorganizate.

A) Sedimentul organizat (componenta biologică) – este insolubil la cald şi în prezența acizilor. Conține celule epiteliale, celule sanguine (hematii, leucocite), cilindri, filamente de mucus, microbi, paraziți, levuri etc.

20.4.7.1 Celulele epiteliale

Aparatul urinar este tapetat cu mai multe straturi de celule epiteliale, cu excepția tubilor uriniferi la care uroteliul este format dintr-un singur strat. Aceste celule prezintă particularități morfologice:

- **Celulele epiteliale pavimentoase (scuamoase, plate)** - sunt mari, plate, cu nucleu picnotic, provin din straturile superficiale ale segmentelor inferioare ale căilor urinare (*Figura 20.7*). În mod normal, aceste celule sunt absente sau rare (se analizează cu Ob. 40x).
- **Celulele epiteliale tranziționale** – sunt fusiforme sau rotunde, au diametrul mai mic decât celulele pavimentoase şi posedă nucleu voluminos. Ele provin din descuamarea calicelor renale, bazinetului, ureterelor, vezicii urinare, până la segmentul proximal al uretrei. Apar frecvent

Tabelul 20.II. Principalele tipuri de cilindri urinari

Nr.	Tipul cilindrului	Caracteristici structurale	Condiții de apariție
1.	Cilindri hialini	- au o structură fină, sunt transparenți, incolori, omogeni, cu lungimi variabile și extremități rotunjite (*Figura 20.10*); - sunt alcătuiți numai din substanța proteică de bază	- normal se evidențiază 0 - 2 cilindri / câmp (Ob. 20x); - însoțesc proteinuriile, mai ales în sindromul nefrotic; - nefropatiile parenchimatoase asociate cu oligurie și pH acid; - la persoane sănătoase apar foarte rar, mai ales după efort fizic prelungit, febră, după administrare de antibiotice
2.	Cilindri granuloși	- frecvent sunt de talie mai mare decât cilindrii hialini, au contur net și extremități rotunjite sau frânte; - prezintă granulații refringente fine sau mari, care provin din dezintegrarea leucocitelor, hematiilor și celulelor epiteliale tubulare (*Figura 20.11*)	- normal se pot găsi 0 – 2 cilindri / câmp (Ob. 20x); - se înregistrează constant în nefropatiile glomerulare sau interstițiale și în necroza tubulară acută (NTA)
3.	Cilindri ciroși	- au aspect de ceară, culoare gălbuie, au contur bine definit, cu margini crestate, sunt foarte fragili încât se găsesc deseori fragmentați (*Figura 20.12*) - se formează prin degenerarea cilindrilor granuloși fixați în lumenul tubular timp îndelungat (cilindri de stază)	- normal sunt absenți; - în sindromul nefrotic, în leziuni grave ale parenchimului renal: GN severă, pielonefrită, amiloidoză
4.	Cilindri hematici	- sunt compuși din hematii care sunt înglobate într-o matrice; - uneori hematiile prezintă alterări morfologice (*Figura 20.13*)	- în mod normal sunt absenți; - indică o hematurie renală; - apar în glomerulonefritele (GN) acute și subacute, GN lupică, rejetul de transplant renal, uneori și în nefropatia tubulo-interstițială
5.	Cilindri leucocitari	- conțin PMN cu diverse grade de degenerescență grupate în formațiuni cilindrice (*Figura 20.14*); - se pot evidenția cu coloratia Sternheimer-Malbin	- normal sunt absenți; - sunt *markeri* ai infecțiilor acute sau cronice ale parenchimului renal; - apar în pielonefrite, nefropatia lupică
6.	Cilindri epiteliali	- au în componență celule epiteliale tubulare aflate în diferite stadii de degenerescență sau se pot încărca cu corpusculi grăsoși	- normal sunt absenți; - sunt *markeri* nespecifici ai leziunilor tubulare; - în GN, în sindromul nefrotic
7.	Cilindri grăsoși	- posedă numeroase granulații grăsoase care acoperă suprafața matricei hialine; - în lumină polarizată apar sub formă de *cruce de Malta*	- normal sunt absenți; - apar în sindromul nefrotic
8.	Cilindri fibroși	- aspect de reticuli speciali de fibrină, de culoare gălbuie	- normal sunt absenți; - sunt de origine sanguină și indică o congestie renală
9.	Cilindri micști	- hialinoleucocitari, hialinohematici, hialinogranuloși, hematoleucocitari, grăsoși – granuloși (*Figura 20.15*)	- normal sunt absenți;

în procese inflamatorii sau neoplasme. In mod fiziologic se pot identifica sub 3 celule tranziționale/câmp (Ob. 40x).

- **Celulele epiteliale renale tubulare** – de formă cubică sau cilindrică, citoplasma fin granulată, cu un nucleu mare voluminos. Aceste celule sunt un *marker* pentru leziunile tubulare. Mai apar în infecții de tract urinar (I.T.U.), după administrare de substanțe toxice renale, chimioterapice. Se pot încărca cu lipide, mai ales cu esteri de colesterol. În sedimentul normal se identifică sub 2 celule tubulare/câmp (Ob. 40x).

Figura 20.10. Cilindri hialini tipici. MCF x 640

Figura 20.11. Cilindri granuloşi cu granulații fine şi grosiere. MCF x 640

Figura 20.12. Cilindru ciros lung cu capăt pătrat (1) alături de un cilindru eritrocitar (hematic) (2) într-o masă de eritrocite. MO x 640

Figura 20.13. Cilindru eritrocitar adevărat (cu eritrocite degenerate) într-o masă de hematii. MCF x 400

Figura 20.14. Cilindru leucocitar cu neutrofile. MO x 640

Figura 20.15. Cilindru mixt (granulos şi grăsos); depunerile lipidice sunt observate la una dintre extremități. MO x 640

20.4.7.2 Leucocitele

Sunt sferice, conțin nucleu lobat şi granulații fine intracitoplasmatice. Le putem identifica izolate, în grupuri (*Figura 20.8*) sau înglobate în cilindri. În urina normală decelăm sub 4-6 leucocite/câmp (Ob. 40x). Prezența lor în număr mare (*piurie)* semnifică I.T.U., tuberculoză renală, procese degenerative ale tractului urinar. Leucocitele rămân intacte în urina acidă şi se deformează în urina alcalină. Identificarea leucocitelor se poate face şi cu coloraţia vitală Sternheimer – Malbin: PMN au nucleul roşu-purpuriu, iar citoplasma albastră-violet.

20.4.7.3 Hematiile

Sunt mai mici decât leucocitele, nu au nucleu, prezintă dublu contur la mişcarea vizei micrometrice (*Figura 20.9*). Hematiile pot apărea sub două forme:

- *izomorfe* – au formă de disc biconcav, cu tentă gălbuie, cu contur precis şi diametrul constant;

Tabelul 20.III. Principalele tipuri de cristale urinare în sedimentul fiziologic

Nr.	Tipul cristalului	Caracteristici morfologice	Condiții de apariție
1	**Oxalatul de Ca^{2+}**	- cristale incolore, mici, sub formă octaedrică *„de plic"* (*Figura 20.17*) sau de halteră (*„de pișcot"*)	- în urinile cu pH acid; - fiziologic se întâlnesc după ingestia de alimente bogate în oxalați (ex. tomate, portocale, usturoi); - patologic apar în diabetul zaharat, boli hepatice; - cristalele sunt solubile în HCl
2	**Fosfatul acid de Ca^{2+}**	- cristale incolore, sub formă de plăci (*„pene"*) adunate în rozete sau plăci subțiri și înguste	- în urina acidă, neutră și slab alcalină; - se dizolvă în HCl
3	**Acidul uric**	- cristale galben-brune polimorfe (rombice, pătrate, cubice, în butoiaș, în stea, haltere, rozete), inegale (*Figura 20.18*);	- în urina cu pH acid; - se dizolvă în NaOH (formează săruri);
	Urații de Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}	- granulații fine amorfe galben-roz;	- în urina acidă; - formează în vasul colector un depozit de culoare cărămiziu-roșietică, cu aspectul lateritei; - cristalele precipită la rece și sunt solubile la cald, în acid acetic, HCl
	Uratul de amoniu	- granule galben-brune cu radiații periferice (spiculi), generând aspect de *„castană sălbatică"*	- preponderent în urina cu pH alcalin, dar și în urinile acide sau neutre; - cristalele sunt solubile în HCl sau acid acetic
4	**Sulfatul acid de Ca^{2+}**	- cristale incolore aciforme lungi și subțiri sau grupate în rozetă	- în urina cu mare aciditate; - cristalele sunt insolubile în acizi
5	**Acidul hipuric**	- prisme romboedrice incolore	- cristale solubile în alcool, insolubile în acid acetic
6	**Fosfatul amoniaco-magnezian**	- cristale incolore prismatice cu aspect de *„capac de coșciug"* *(Figura 20.19)*	- în urinile alcaline; - se întâlnesc frecvent în bolile însoțite de stază urinară asociată cu I.T.U., și de asemenea în hipertrofia de prostată, cistita cronică; - cristalele sunt solubile în acizi și insolubile în NaOH
7	**Fosfat bicalcic**	- cristale aciculare dispuse în stea sau în cruce	
	Fosfat tricalcic	- granule amorfe de culoare alb-cenușie;	- în urinile alcaline; - se dizolvă în HCl, acid acetic
	Fosfații bazici de Mg^{2+}	- tablete rombice refringente, incolore, în formă de *„țăndări de geam"*;	
8.	**Carbonatul de Ca^{2+}**	- aspect de granulații amorfe, sferice sau în halteră, albe-cenușii; - în vasul colector formează un depozit de culoare albă-cenușie	- în urinile alcaline, neutre sau slab acide; - se dizolvă în acid acetic cu degajare de CO_2

- *dismorfe* – sunt vidate de hemoglobină, apar decolorate, sunt de mărimi diferite și au un diametru mai mic. Membrana lor este discontinuă și prezintă evaginări veziculare, de aceea se mai numesc *acantocite*. Se vizualizează foarte bine cu microscopia în contrast de fază.

Urina normală conține sub 4-6 hematii/ câmp (Ob. 40x). În hematuria glomerulară peste 80% din eritrocite sunt dismorfe și decolorate. Hematuria nonglomerulară se caracterizează prin prezența de peste 80% de hematii izomorfe. În hematuria mixtă se înregistrează raporturi aproximativ egale de hematii izomorfe și dismorfe. În urinile acide hematiile se pot deforma devenind crenelate, iar în urinile cu pH alcalin se edematiază devenind rotunde.

20.4.7.4 Cilindrii

Sunt mulaje ale tubilor renali, fiind considerați patognomonici leziunilor renale. Se prezintă sub forma unor elemente alungite, cilindrice, bine conturate, cu capete rotunjite sau tăiate drept. Cilindrii pot fi clasificați după mecanismul de formare și după structură (*Tabelul 20.II*).

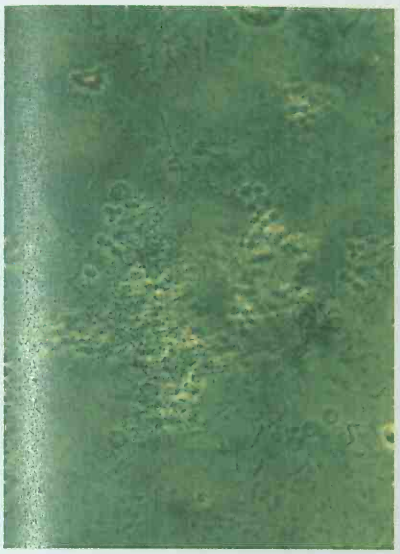


Figura 20.16. Levuri de forme diferite izolate şi grupate dispuse într-o masă de floră. MCF x 400 (filtru verde)

Figura 20.17. Un macrocristal de oxalat de calciu dihidrat pe care s-au suprapus grupuri de microcristale de oxalat de calciu monohidrat. MO x 640

Figura 20.18. Microcristale de acid uric de formă ovoidală(1) şi neregulat ovoidală. MO x 640

Figura 20.19. Macrocristale de fosfat amoniaco-magnezian în formă de "capac de sicriu". MO x 400

Cilindrii nu trebuie confundați cu alte formațiuni lipsite de semnificație patologică, cum ar fi:

a) *Pseudocilindrii* – sunt aglomerări de produse anorganice (urați, fosfați) sau organice (puroi, fibrină). Eliminarea confuziilor se face prin examinarea la microscopia în contrast de fază şi lumină polarizată;

b) *Cilindroizii* – au formă de panglică cu striațiile longitudinale şi capete ascuțite, frecvent unul din capete este despicat, marginile nu sunt perfect paralele.

20.4.7.5 Picăturile de lipide

Apar în urină numai în context patologic. Se prezintă sub formă de picături libere de grăsime şi corpusculi ovalari grăsoşi. Se pot identifica prin colorare cu Sudan III când dobândesc o culoare portocaliu-roşie sau în lumină polarizată luând aspect de *cruce de Malta*. Apar în sindromul nefrotic, GN membranoase, după ingestia de etilenglicol sau mercur.

20.4.7.6 Levurile (semnificație prezintă mai ales *Candida albicans*)

Au formă ovală sau rotundă, sunt inegale, incolore şi pot apare izolate sau grupate – înmugurite (*Figura 20.16*). Nu au dublu contur. Se pot confunda cu hematiile (adăugarea unei picături de acid acetic 3% va induce liza hematiilor, în timp ce levurile rămân integre).

20.4.7.7 Paraziți

Sunt frecvent întâlniți: *Trichomonas vaginalis, Enterobius vermicularis, Schistosoma haematobium, Filaria bancrofti.*

20.4.7.8 Flora microbiană

Dacă este în cantitate mare, trebuie examinată prin urocultură.

20.4.7.9 Celulele neoplazice

Necesită colorare cu May-Grunwald-Giemsa sau cu metoda Papanicolau.

20.4.7.10 Filamentele de mucus

Se prezintă sub forma unor benzi subțiri, albicioase.

20.4.7.11 Alte elemente organice

Spermatozoizi, corpusculi de lecitină (rotunzi, alcătuiți din straturi concentrice, se întâlnesc în afecțiuni prostatice).

B) Sedimentul neorganizat (componenta chimică) – este reprezentat de săruri în stare amorfă sau cristalină, de origine metabolică, organică sau anorganică. Urina normală poate conține o anumită cantitate de cristale. În urma diverselor modificări ale pH-ului urinar, ale volumului urinar (oligurie) sau consecutiv unor anumite diete, aceste săruri pot precipita. Cristaluria devine semnificativă în litiaza urinară. În condiții normale sedimentul urinar poate conține următoarele elemente (*Tabelul 20.III*): cristale de oxalat de calciu, fosfat de calciu, fosfat amoniaco-magnezian, sulfat de calciu, carbonat de calciu, urat de calciu, magneziu, sodiu și potasiu, acid uric (în urina cu pH acid), acid hipuric.

Sedimentul urinar **patologic** poate conține cristale de:

- *tirozină* – cristale sub formă de ace fine, gălbui dispuse sub formă de snopi sau de stea. Sunt solubile în NH_4OH;
- *leucină* – cristale sferice galben-brune (*Figura 20.20*), cu striații concentrice sau radiare, insolubile în HCl sau eter;
- *cistina* - cristale sub formă de tablete hexagonale, incolore, suprapuse (*Figura 20.21*), mai greu solubile decât cele de cisteină (cistina este forma dimerică rezultată prin oxidarea cisteinei). Apar în tulburări ale metabolismului protidic. Sunt solubile în HCl, dar nu și în acid acetic;
- *colesterol* – cristale sub formă de *„țăndări de sticlă"*, rombice, subțiri, incolore, cu marginile tăiate în scară (*Figura 20.22*). Se decelează în sindromul nefrotic. Sunt solubile în cloroform și eter, dar nu în acizi sau alcali;
- *bilirubină* – ace roșii-brune care se colorează în verde cu acidul azotic;
- *xantină* – romburi mici incolore;
- *origine medicamentoasă* (acid acetilsalicilic, acid ascorbic, sulfamide, fenacetina etc.) – cu aspect polimorf (*Figura 20.23*).

Examenul microscopic cantitativ al leucocitelor și hematiilor oferă informații mai exacte și permite urmărirea în dinamică a modificărilor urinare.

Metoda Addis-Hamburger – proba se recoltează din a 2-a urină de dimineață și urină emisă în următoarele 3 ore, de pacientul menținut în clinostatism.

Valorile normale: leucocite<2000/minut, hematii:100–1000/minut, cilindri absenți.

Alterări fiziologice ale sedimentului urinar:

- excreția crescută de proteine, celule și cilindri apare în stări febrile, după efort fizic, insuficiență cardiacă congestivă, inaniție, lordoză posturală;
- după administrarea de laxative pot apare în sediment celule gigante multinucleate;
- diureticele de ansă nu induc proteinurie, dar cresc eliminarea de hematii, leucocite, celule epiteliale și produc o cilindrurie importantă;
- în anurie putem identifica piurie, hematurie.

20.4.8 Alte determinări din urină

În urina adunată 24 de ore se pot determina o serie de componenți anorganici (ioni) și organici (acidul uric, creatinina, acidul vanil mandelic, acidul 5-hidroxi indolacetic, metaboliți hormonali).

Creșterea cantității urobilinogenului în urină pledează pentru o afecțiune hepatocelulară, iar lipsa lui totală semnalizează o ocluzie biliară totală (icter mecanic).

Numai bilirubina directă (conjugată) se elimină în urină, nu și bilirubina indirectă (legată de albumină).

Pentru explorarea corectă a funcțiilor renale, privind echilibrul hidromineral, acidobazic, de filtrare glomerulară, de reabsorbție și de secreție tubulară, se recomandă determinarea paralelă a parametrilor respectivi, atât în plasmă cât și în urina colectată 24 de ore.

20.5 Sindroame nefrologice

20.5.1 Sindromul nefritic

Are ca substrat o inflamație a parenchimului renal, cu atingere predominant glomerulară, caracterizat prin proteinurie < 3,5 g / 24 h, hematurie cu hematii dismorfe, cilindrurie (cilindrii hematici fiind patognomonici), edeme, HTA, cu sau fără insuficiență renală. Acest sindrom recunoaște în majoritatea cazurilor o patogenie imunologică. Se produce o proliferare a celulelor endoteliale, epiteliale, mezangiale, cu depozite de imunoglobuline, complement și fibrinogen la nivel glomerular. Cauze:

- glomerulonefrita (GN) difuză acută poststreptococică;
- GN din LED, endocardită, crioglobulinemii;
- GN cu IgA; GN cu anticorpi anti membrană bazală glomerulară;
- toxic-medicamentoase: neomicina, amfotericina, citostatice;
- tromboza de venă cavă, de venă renală, insuficiența cardiacă, pericardita.

Investigații de laborator:

a) Examenul urinei:

- examenul sumar de urină evidențiază proteine, hematii;

Figura 20.20. Trei cristale de leucină, MO x 400

Figura 20.21. Cristale de cistină prezentând diferite moduri de dispunere.MO x 400

Figura 20.22. Un cristal gigant de colesterol rezultat prin suprapunere de cristale. MO x 640

Figura 20.23. Cristale de sulfamidă, MO x 640

- proteinuria <3,5 g/24 h;
- sedimentul urinar: hematii dismorfe, cilindrii hematici, hematuria este superioară leucocituriei;
- electroforeza proteinelor urinare decelează o proteinurie de tip glomerular;
- urocultura;

b) Examenul sanguin:

- dozări serice de Ig : IgA seric creşte în GN cu depozite mezangiale de IgA. În GN cu leziuni minime se observă creşterea de IgM şi IgE, iar IgG şi IgA sunt scăzute;
- determinarea de antigene, implicate în reacţii imune, de origine virală, bacteriană, parazitară, alimentară etc.;
- dozarea serică a complexelor imune circulante;
- determinarea Ac anti-MBG;
- dozarea complementului seric – scăderea sa se observă în GNA poststreptococică, GN din endocardita bacteriană, din LES. Se poate urmări în dinamică – complementul seric revine la normal în 6-8 săptămâni în caz de evoluţie favorabilă;
- clearance-ul de creatinină scade dacă apare insuficienţă renală;
- determinarea produşilor de degradare ai fibrinei PDF din ser şi urină.

20.5.2 Sindromul nefrotic

Este caracterizat prin proteinurie masivă (> 3,5 g / 24 h) cu hipoalbuminemie (sinteza hepatică e inferioară pierderilor urinare de proteine), edeme, hiperlipemie. Se datorează tulburărilor de permeabilitate ale membranei bazale glomerulare, cu sau fără depuneri de imunoglobuline şi/sau complement.

20.5.2.1 Etiologie

- ***Sindrom nefrotic primar*** (80% din cazuri):
  - GN cu leziuni minime (nu poate fi evidenţiată la microscopia optică, dar microscopia electronică decelează fuziunea podocitelor);
  - GN membranoasă;
  - GN cu depozite mezangiale de IgA;
  - GN membranoproliferativă - asociază depuneri de complexe imune şi complement;
  - Glomeruloscleroza focală şi segmentară;
  - GN fibrilară.
- ***Sindrom nefrotic secundar*** (20%)
  - cauze infecţioase, toxic-medicamentoase, alergice, neoplazice;

- colagenoze, vasculite, mielom multiplu, amiloidoză, diabet zaharat, leucemii, limfoame, vasculite, nefroangioscleroză.

20.5.2.2 Fiziopatologie

- *tulburări ale metabolismului proteic*:
  - proteinuria este urmată de hipoproteinemie
  - prin pierderea de transferină apare o anemie hipocromă rezistentă la terapia cu fier
  - pierderea proteinelor ce fixează Zn conduce la deprimarea imunității celulare
  - pierderea proteinelor care leagă cortizolul favorizează dezvoltarea mai rapidă a sindromului Cushing iatrogen;
  - pierderea de ceruloplasmină va genera deficit de Cu;
  - pierderea globulinei ce transportă vitamina D se însoțește de hipocalcemie și hiperparatiroidism secundar.
- *tulburări ale metabolismului lipidic:* în sindromul nefrotic crește colesterolul, trigliceridele și lipidele totale. Se înregistrează creșterea concentrației de apolipoproteină B, C II și E, crește lipoproteina (a); hiperlipemia favorizează arterioscleroza, participă la hipercoagulabilitate și la scăderea imunității celulare; La examenul urinei cu microscopul cu lumină polarizată se evidențiază cristale birefringente caracteristice, expresie a lipiduriei.
- *tulburări ale metabolismului hidro-mineral*: edeme, sete, oligurie cu hiponatriurie;
- *tulburări ale hemostazei*: crește concentrația fibrinogenului, a factorilor II, V, VII, VIII, X și XIII cu hipercoagulabilitate și tendință la tromboze; se înregistrează scăderea concentrației de antitrombina III și de plasminogen.
- *tendința la infecții*: prin scăderea concentrației globulinelor plasmatice și a complementului prin pierdere urinară sau deficit de sinteză.

20.5.2.3 Investigații de laborator

a) Examenul urinei:
- densitatea urinară poate fi crescută;
- proteinurie >3,5g/24 h;
- sedimentul urinar: celule epiteliale, cilindri hialini (în sindromul nefrotic pur). Apariția de hematii pledează pentru o leziune glomerulară (sindrom nefrotic impur). Putem identifica leucociturie, iar la microscopul cu lumină polarizată se evidențiază cristale birefringente;
- urocultura este de obicei negativă;
- uneori apare o glucozurie moderată;
- PDF pot fi prezenți.

b) Examenul sanguin:
- produșii de retenție azotată sunt în limite normale în GN cu leziuni minime;
- VSH-ul și fibrinogenul sunt crescute;
- electroforeza proteinelor serice identifică hipoproteinemie cu reducerea albuminei și a α_1-globulinei, creșterea nivelului de α_2- și β-globuline, în timp ce γ-globulinele pot fi normale sau diminuate;
- colesterolul și trigliceridele sunt crescute;
- ionograma serică indică hiponatriemie, hipocloremie, hipo-/ hiperpotasemie, hipocalcemie, normo-/ hiperfosfatemie;
- determinări de imunoglobuline plasmatice;
- proteina C reactivă este normală, dacă nu se suprapune o complicație infecțioasă.

20.5.3 Insuficiența renală acută (IRA)

Este un sindrom acut de deteriorare a funcțiilor renale care are ca și consecință oligurie (<400 ml/24 h), creșterea produșilor de retenție azotată (uree, creatinină), tulburări ale echilibrului hidroelectrolitic și acido-bazic. Evoluția este variabilă în raport cu etiologia, corectitudinea și precocitatea instituirii tratamentului.

20.5.3.1 Cauze

a) prerenale – hipovolemia (hemoragii, arsuri, vărsături, diaree, hipertermie), scăderea debitului cardiac (infarct miocardic, tahiaritmii paroxistice prelungite, embolie pulmonară acută), vasodilatația periferică (septicemia cu germeni Gram negativi, reacții anafilactice);

b) renale – glomerulonefrite, pielonefrite, nefrite interstițiale, necroza tubulară acută, leziuni vasculare cu ischemie renală (tromboze, anevrism disecant de aortă, HTA malignă, vasculite, sindrom hemolitic-uremic), medicamente nefrotoxice (ex. aminoglicozide, cisplatin);

c) postrenale – obstrucții ale tractului urinar (ex. calculi, hiperplazie benignă de prostată, tumori ale tractului urinar), traumatisme vezicale. Obstrucția care se ivește deasupra joncțiunii vezico-ureterale trebuie să fie bilaterală pentru a avea un răsunet major asupra fluxului urinar.

IRA prerenală (funcțională, azotemie, uremie) reprezintă 80% din cazurile de IRA. Este rezultatul unui răspuns fiziologic normal la hipo-

volemie sau la scăderea presiunii arteriale. Stimularea sistemului RAA și secreția de ADH generează producția unui volum scăzut și foarte concentrat de urină cu natriurie scăzută (< 20 mmol/l). Funcția tubulară renală este normală, dar scăderea RFG determină retenția substanțelor care, în mod normal, sunt excretate prin filtrare (ex. creatinina, ureea - raportul concentrației uree urinară: uree plasmatică este >20). Hipoperfuzia renală induce vasoconstricție renală intensă cu redistribuția fluxului sanguin renal și scăderea consecutivă a RFG, dar cu conservarea funcției tubulare. Netratată, uremia prerenală poate progresa spre IRA intrinsecă. Aceasta poate fi prevenită, dacă perfuzia renală este restabilită anterior apariției leziunilor structurale.

În IRA renală (intrinsecă, organică), leziunile glomerulare nu sunt comune în necroza tubulară acută. Totuși, RFG diminuă prin hipoperfuzie glomerulară, generată la rândul ei de vasoconstricția arteriolară. Revenirea la normal a RFG, după corecția deficitului circulator, reprezintă un eșec comun. Motivele nu sunt clare, dar sunt implicate eliminarea intrarenală de substanțe vasoactive și obstrucția lumenului tubular prin cilindrii tubulari sau edem interstițial. Natriuria depășește de obicei 40 mmol/l, iar raportul concentrațiilor uree urinară: uree plasmatică este sub 10, iar raportul dintre osmolaritatea urinară și cea plasmatică este sub 1,1.

În IRA postrenală (mecanică, obstructivă) obstrucția fluxului urinar determină creșterea presiunii hidrostatice, care acționează în opoziție cu RFG și dacă se prelungește sfârșește în leziuni tubulare renale secundare. Reversibilitatea leziunilor renale în IRA obstructivă depinde de extinderea și durata lor. Anuria completă este rară în IRA și reprezintă un indicator puternic al prezenței obstrucției.

20.5.3.2 Fazele clinico-biochimice ale IRA

a) Faza preanurică (inițială) are durata de 24-36 ore, debutul este brutal sau insidios. Se caracterizează prin oligurie <400 ml/24 h cu proteinurie discretă, azoturie scăzută, iar ureea și creatinina serice sunt ușor crescute.

b) Faza anurică are durata de 9-17 zile. Clinic apar manifestări digestive, cardio-vasculare, neurologice, respiratorii, cutanate, renale, generale. Volumul urinar este sub 400 ml/24 h (în 40% din cazuri nu scade sub această valoare). Osmolaritatea urinară este scăzută. Urina este închisă la culoare (bogată în pigmenți) și proteine. Proteinuria se situează între 1–10 g/24 h. Sedimentul urinar conține celule epiteliale numeroase, *terci epitelial*, leucocite, eritrocite, cilindrii hematici, cilindrii granuloși, cristale de diverse tipuri, germeni.

La bolnavii hipercatabolici (cu febră, stare septică sau traumatisme) ureea și creatinina serice cresc zilnic cu peste 6mmol/l, respectiv 60 µmol/l; se produce o creștere a produșilor de retenție azotată; apar tulburări hidroelectrolitice: retenție hidrosodată, hiperkaliemie, hiperfosfatemie, hipermagneziemie, hipocalcemie (fie prin diminuarea sintezei 1,25-dihidroxicolecalciferolului, fie prin rezistență la acțiunea PTH-ului), perturbări ale echilibrului acido-bazic.

c) Faza poliurică se caracterizează prin eliminarea a peste 4 l urină diluată/24 h; se datorează reluării FG, dar fără reluarea funcției tubulare. În această perioadă există riscul pierderii excesive de apă și electroliți; produșii de retenție azotată scad progresiv. Proteinuria este discretă, de aproximativ 1 g/zi. Sedimentul urinar conține frecvente celule epiteliale, hematii, leucocite, germeni.

d) Faza de recuperare funcțională se asociază cu o revenire treptată la normal a funcțiilor tubulare, cu regenerarea celulelor tubulare, dar o deficiență de concentrare poate fi detectată multe luni după faza acută.

20.5.4 Insuficiența renală cronică (IRC)

Este un sindrom cronic, cu debut insidios, caracterizat prin incapacitatea rinichilor de a-și asigura funcțiile normale, datorită leziunilor organice, ireversibile, cantonate în ambii rinichi sau pe rinichi unic. IRC poate fi explicată în două moduri:

a) teoria „nefronului intact" care se referă la reducerea numărului de nefroni activi, iar nefronii restanți devin hiperfuncționali;

b) teoria clasică a „nefronului patologic", cu alterarea difuză, dar incompletă a tuturor nefronilor.

Pacienții pot rămâne asimptomatici înainte de scăderea RFG sub 15 ml/min. Apare deficit în concentrarea urinei, poliuria nu este marcată (nu depășește 4 l/zi, pentru că RFG este diminuată).

Balanța Na^+ este menținută înainte ca RFG să scadă sub 20 ml/min. Sindromul *„nefritei cu pierdere de sare"* apare cel mai frecvent la pacienții la care boala renală afectează tubii renali: ex. nefropatia la analgezice, boala polichistică și pielonefrita cronică (concentrația plasmatică a Na^+ va fi scăzută). Hiperpotasemia apare tardiv, dar poate fi precipitată de deteriorarea funcției renale și de utilizarea inadecvată a diureticelor economisitoare de K^+.

Tabelul 20.IV. Caracteristici ale principalilor calculi urinari

Nr.	Tipul calculului	Culoarea	Aspectul extern	Consistența	Aspectul radiologic
1.	Oxalatul de Ca^{2+}	galben-brună, verzuie sau neagră	- neted sau cu excrescențe rotunjite muriforme; - structură cristalină vizibilă la exterior	foarte duri	radioopaci
2.	Fosfați de Ca^{2+} și Mg^{2+}	alb-gălbuie sau cenușie	- neted	sfărâmicioși	radioopaci
3.	Fosfatul amoniaco-magnezian	albă cu nuanțe de cenușiu	- structură cristalină	sfărâmicioși	radioopaci
4.	Acidul uric și urații	galben-portocaliu până la brun-roșcat	- formă globoidă, mici și compacți	duri - friabili	transparenți
5.	Cistina	alb-gălbuie sau verzuie	- translucid, ceros	denși	radioopaci

Pacienții cu IRC tind să dezvolte acidoză metabolică. Capacitatea de tamponare urinară este deficitară ca rezultat al scăderii excreției de fosfat și a sintezei de NH_3 /eliminării de NH_4^+. Capacitatea nefronilor de a reabsorbi bicarbonatul filtrat este deficitară, astfel crește concentrația plasmatică a ionilor de H^+ și scade bicarbonatul, dar aceste modificări progresează lent, datorită tamponării excesului de ioni de H^+ în țesutul osos. Mulți pacienți cu IRC devin hipocalcemici și în timp vor dezvolta osteodistrofie renală. Se reduce producția renală de vitamina D și consecutiv se înregistrează hipocalcemie și hiperparatiroidism secundar. Tamponarea ionilor de H^+ de către țesutul osos conduce la demineralizare osoasă. Creșterea nivelului de PTH cauzează scăderea reabsorbției renale de fosfați. Deprecierea RFG (care este factorul limitant în excreția de fosfați), va conduce la hiperfosfatemie, ce va inhiba sinteza de vitamină D.

Printre consecințele endocrine ale IRC se numără toleranța alterată la glucoză datorită rezistenței la insulină. În timp, pacienții cu IRC vor dezvolta anemie normocromă normocitară datorită inhibării sintezei de eritropoetină, dar și toxinelor remanente ce deprimă măduva osoasă hematogenă.

În concluzie, în IRC apar următoarele modificări:

- ***sindromul de retenție a toxinelor uremice***: uree, creatinină, acid uric.
- ***sindromul de tulburare a echilibrului hidro-electrolitic*** cu pierderi renale de Na^+, oligoanurie, poliurie compensatorie. Bolnavii cu IRC își mențin echilibrul K^+ până când RFG scade sub 25% din valoarea normală. Apare hipocalcemie și hiperfosfatemie.
- ***sindromul de tulburare a echilibrului acido-bazic*** cu acidoză metabolică hipercloremică.
- ***sindromul anemic*** - anemie normocromă normocitară

Alte modificări de laborator:

- examenul sumar de urină decelează densitate și osmolaritate scăzute, proteinurie, produși azotați scăzuți, electroliți variabili;
- sedimentul urinar conține hematii decolorate, disforme, frecvente leucocite izolate și grupate, numeroase celule epiteliale, cilindri variați;
- urocultura poate fi negativă sau pozitivă.

IRC evoluează în cinci stadii: stadiul de deplină compensare, stadiul compensat, stadiul decompensat, stadiul uremic și stadiul de uremie depășită. În raport cu gravitatea, IRC poate fi:

- ușoară: C_{Cr} între 50-100 ml/min;
- moderată: C_{Cr} între 10-50 ml/min;
- severă: C_{Cr} sub 10 ml/min.

20.5.5 Litiaza renală

Reprezintă prezența de calculi în căile urinare, care se formează prin depuneri de săruri anorganice sau organice în tractul urinar.

Compoziția chimică a calculilor:

- 80% conțin Ca^{2+};
- 15% struvit ($MgNH_4PO_4$) – apar în infecții ale tractului urinar produse de *Proteus vulgaris* care posedă capacitatea de a converti ureea în NH_3 și bicarbonat;
- 5% au în compoziție acid uric (se asociază uneori cu hiperuricemia cu sau fără manifestări clinice de gută);
- sub 1% conțin cistină (Cys are solubilitate scăzută în urină, comparativ cu alți aminoacizi

transportați de acelaşi sistem transportor tubular: Lys, Orn, Arg).

Etapele litogenezei:

- hiperconcentrarea urinei în cristaloizi este elementul central (cristaluria);
- formarea nucleelor de condensare;
- creşterea nucleelor;
- formarea calculilor urinari.

Factorii precipitanți ai litiazei renale:

- pH-ul urinar acid favorizează precipitarea acidului uric, a cistinei;
- pH-ul alcalin crează condiții pentru formarea calculilor fosfato-amoniaco-magnezieni şi a celor cu conținut de fosfat de calciu;
- pH-ul indiferent facilitează dezvoltarea calculilor de acid oxalic;
- urostaza;
- infecția urinară;
- supersaturarea urinei;
- scăderea concentrației inhibitorilor – urina normală conține inhibitori (pirofosfați şi glicoproteine), care inhibă creşterea cristalelor de fosfat de Ca^{2+} şi oxalat de Ca^{2+};
- leziunile uroteliale.

Clinic apare colica renală, însoțită de hematurie, proteinurie, leucociturie (piurie).

Analiza calculului este singura investigație care furnizează diagnosticul de certitudine al tipului de litiază. Se poate realiza prin metode chimice sau fizice (cu lumină polarizată, prin difracție de raze X, microscopie electronică de baleiaj). Calculii care au în compoziție Ca^{2+} sunt albi, radioopaci; cei care conțin acid uric sunt mici, friabili, galben-maronii, radiotransparenți, dar pot fi vizualizați prin examinare ultrasonică sau urografie (*Tabelul 20.IV*).

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p. 315-344.
2. Bishop M.L., Fody E.P. – *Reference values for frequently assayed clinical chemistry analytes*. In *Clinical Chemistry: Principles procedures, correlations*, 5th Ed, Williams & Wilkins, 2005.
3. Bonventre, J. – *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A specific and sensitive biomarker of kidney injury*, Scand J Clin&Lab Invest, 2008, 68 (S241): 78-83.
4. Delanghe J.R – *How to establish glomerular filtration rate in children*, Scand J Clin&Lab Invest, 2008, 68 (S241): 46-51.
5. Devlin T.–*Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, p. 1045-1058.
6. Dumitraşcu V., Gîju S., Grecu D.Ş. – Sedimentul urinar, Ed de Vest Timişoara, 2007, 42-289.
7. Fischbach F. – *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*, 2rd Ed, Lippincott Company, 1984, p. 105-186.
8. Henry J. B. – Clinical *Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th Ed, Saunders, 2001, p. 367-402.
9. Kaplan L.A., Pesce A.J. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984, p. 403-418, 996-1030.
10. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry*, 6th Ed, Mosby, 2008, p. 69-93.
11. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, 1994, p. 371-386, 513-548.
12. Mihele Denisa – *Biochimie Clinică*, Ed. Medicală, 2001.
13. Myers, G.L. – *Standardization of serum creatinine measurement: Theory and practice*, Scand J Clin&Lab Invest, 68 (S241), 2008, 57-63.
14. Pagana K., Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby-ELSEVIER, 3rd Ed, 2006, p. 953-1031.
15. Turgeon M. L. – *Clinical Laboratory Science - The basics and routine techniques*, Evolve-Elsevier, 5th Ed, 2007, p.349-424.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 21.
Patochimia funcțiilor hepatice

Andrea Marta Fodor

Ficatul este cel mai mare organ glandular din organism (masa acestuia la adult este de 1,2 - 1,5 kg). Din punct de vedere structural și funcțional, conține 4 sisteme diferite: a) parenchimul hepatic (hepatocitele), b) sistemul de drenaj biliar, c) sistemul vascular și d) sistemul monocito-macrofagic.

21.1 Elemente structurale și funcționale

21.1.1 Parenchimul hepatic

Unitatea structurală și funcțională a ficatului este lobulul hepatic; de formă poliedrică, aceste structuri sunt organizate în jurul venelor centrale lobulare și au în colțuri triada vasculară: venă portă (ramificații ale acesteia), arteră hepatică, duct biliar (*Figura 21.1*). Hepatocitele (aranjate în coloane) comunică între ele prin orificii deschise multiple (*gap junctions*) ale membranelor, fiind astfel capabile să funcționeze în ansamblu. Prin capacitatea lor funcțională mare și prin variatele lor funcții metabolice, ansamblul hepatocitelor reprezintă laboratorul biochimic central al organismului. Din punct de vedere structural, polul vascular (suprafața hepatocitelor situată spre sinusoidul hepatic) prezintă microvilozități ale membranei, care sub forma unei margini în perie mărește considerabil suprafața de contact cu sângele sinusoidelor (spațiul Disse); schimburile sunt amplificate și datorită faptului că nu există membrană bazală vasculară între hepatocite și celulele endoteliale (celulele endoteliale având spații largi între ele, în care se postează numeroase celule Kupffer – fagocite mononucleare). Polul biliar, dispune de un labirint bazal, mai puțin complicat. Aproximativ 75% din fluxul sanguin hepatic provine din vena portă, care aduce sângele din teritoriul intestinal. Circulația sanguină în interiorul lobulului hepatic (dinspre vena portă și artera hepatică spre vena centrolobulară) este inversă sensului de circulație al bilei în canaliculele biliare.

Citoplasma hepatocitelor este bogată în ergastoplasmă rugoasă, cu multe granule (ribozomi) și vezicule. La acest nivel are loc biosinteza multor proteine, lipo- și glucoproteine (fibrinogenul, factori de coagulare, reactanți de fază acută). La nivelul reticulului endoplasmatic neted și al aparatului Golgi, are loc transportul, depozitarea numeroșilor produși (glicogen, vitamine, lipide, metale) și exportul altora (glucoza, proteine, lipo- și glucoproteine, bila). Conținutul enzimatic bogat al hepatocitelor face posibilă desfășurarea tuturor transformărilor biochimice metabolice, dintre care unele (oxidoreducerile, transferurile de radicali) sunt utilizate în scopul detoxifierii unor substanțe formate în organism sau pătrunse în el.

Din punct de vedere diagnostic, enzimele hepatocitelor pot fi cuprinse în 3 grupe majore:

1. Enzimele de secreție, ca pseudocolinesteraza și unii factori plasmatici de coagulare, care se secretă în sânge. Scăderea activității lor în plasmă reprezintă semnul unei leziuni hepatocelulare grave.

2. Enzimele de excreție: fosfataza alcalină, γ–glutamil-transpeptidaza, leucin-amino-peptidaza, 5-nucleotidaza, sunt formate în hepatocite sau celulele ductelor biliare și se excretă prin bilă. Creșterea activității plasmatice a acestor enzime pledează pentru tulburarea drenajului biliar.

3. Enzimele indicatoare ale citolizei sunt enzimele proprii hepatocitelor, localizate fie în ci-

toplasmă (C-enzime: GPT, aldolaza, LDH), fie în microsomi (M-enzime: GOT, GLDH). În condiții normale, aceste enzime ajung numai în cantități reduse în circulație (consecința reînnoirii fiziologice a hepatocitelor), ca urmare activitatea lor plasmatică este mică. În cazul unor leziuni hepatocelulare, pătrund în sânge întâi C-enzimele, iar în cazul unor leziuni mai grave, crește și activitatea plasmatică a M-enzimelor.

21.1.2 Funcțiile metabolice ale hepatocitelor

21.1.2.1 Metabolismul glucidelor

Glucoza sanguină este sursa energetică principală pentru majoritatea celulelor organismului, mai ales pentru acelea care folosesc preferențial glucoza: neuroni, elemente figurate sanguine. Ficatul joacă un rol central în metabolismul carbohidraților, în special în menținerea glicemiei. Această funcție depinde de capacitatea ficatului de a stoca excesul de glucoză postprandial, de a-l elibera în perioadele interprandiale și de a sintetiza *de novo* glucoză (vezi *7.1*). Rezervele de glicogen ale hepatocitelor sunt limitate (aproximativ 80 g). În ciuda acestei cantități modeste, ficatul poate susține continuu concentrația constantă a glucozei sanguine, prin asigurarea raportului constant între glicogenoliză și glicogenogeneză. Lipsa congenitală a unor enzime implicate în glicogenoliză, se manifestă sub forma diferitelor glicogenoze, prezentate în *Tabelul 7.I.*

Dintre monozaharidele reabsorbite și transportate în ficat, manoza și fructoza se transformă spontan în glucoză, prin epimerizare. Transformarea galactozei în glucoză are loc prin intermediul UDP-glucozei și necesită activitatea galactoziltransferazei. Lipsa congenitală a acestei enzime duce la manifestarea galactozemiei. Pentozele sunt încadrate în șuntul pentozofosfatic al oxidării directe a glucozei. Produsul final al degradării anaerobe a glucozei în mușchi – lactatul, va ajunge înapoi la mușchi prin ciclul Cori (după neoformarea de glucoză): pe seama energiei eliberate în cursul oxidării a 20% din acidul lactic, 80% se transformă în glucoză (vezi *7.1.3*).

21.1.2.2 Metabolismul lipidelor

Hepatocitele transformă excesul de glucoză și de aminoacizi glucogenetici în grăsimi neutre și colesterol. Din excedentul de Acetil CoA rezultat prin descompunerea acizilor grași în ficat se sintetizează corpii cetonici. În hepatocite se sintetizează trigliceride, fosfolipide, colesterol și acizi biliari, se activează vitamina D (25-hidroxilarea), se formează lipoproteinele VLDL și HDL. În hepatocitele cu funcție deficitară se limitează treptat capacitatea mobilizării lipidelor: din acest motiv poate apare o steatoză hepatică mai mult sau mai puțin accentuată.

21.1.2.3 Metabolismul proteinelor

Atât anabolismul, cât și catabolismul proteinelor se desfășoară foarte intens în hepatocite. În ficat se sintetizează majoritatea proteinelor plasmatice (vezi *10.4*) cu excepția γ–globulinelor. Concentrația plasmatică a albuminei și mai ales a factorilor de coagulare II, VII, IX și X (determinată sub formă de activitate de protrombină) este un bun indice al capacității de sinteză hepatică. Proteinele din clasele alfa și beta globulinelor se sintetizează de asemenea la nivel hepatic, citokinele proinflamatorii (IL-6) având un important efect stimulator asupra producerii proteinelor de fază acută (vezi *10.4.6*). Detoxifierea prin ciclul ureei (Krebs-Henseleit) a amoniacului eliberat prin dezaminarea aminoacizilor, are loc exclusiv în hepatocite (vezi și *Capitolul 9.4*). Creșterea amoniemiei (din cauza insuficienței sau lipsei detoxifierii amoniacului) este cauza comei hepatice, care se manifestă în faza finală a insuficienței hepatice.

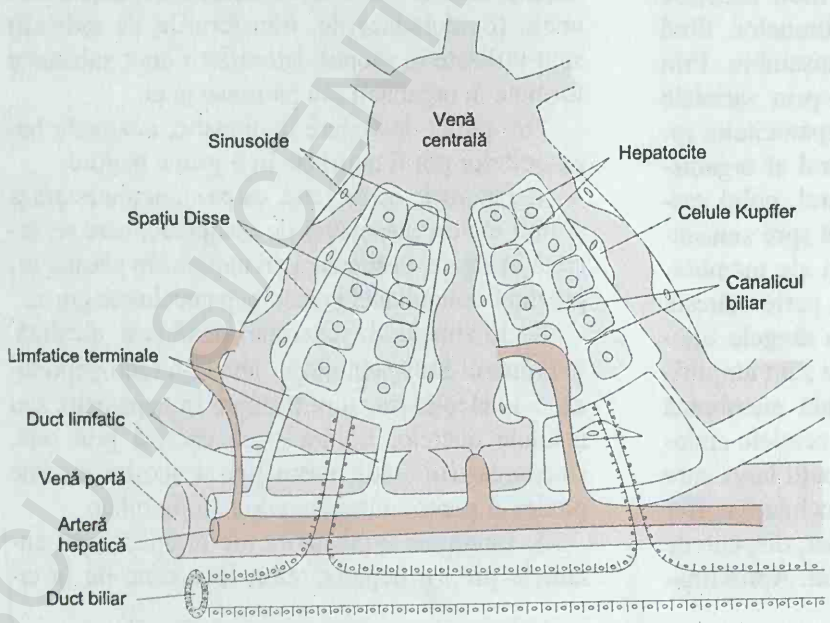


Figura 21.1. Structura lobulului hepatic

21.1.2.4 Funcţia de depozit a ficatului

Constă în acumularea unor substanţe de rezervă, ca glicogenul, proteine, lipide, vitamine şi unele oligoelemente. Ficatul serveşte şi drept depozit de sânge mobilizabil. Ficatul poate stoca o cantitate de vitamină B12 suficientă pentru aproximativ 3-6 ani de zile, alături de vitamine liposolubile (A, D şi K) şi fier sub formă de feritină.

21.1.2.5 Funcţia de detoxifiere a ficatului

Se realizează prin intermediul activităţii bogatului sistem enzimatic al hepatocitelor. Cu ajutorul diferitelor transformări biochimice catalizate de enzime, substanţele în exces (hormoni steroizi şi polipeptidici, mediatori) sau toxice (amoniac, amine biogene) de origine endogenă şi exogenă, pot fi neutralizate sau inactivate prin oxidare, reducere, proteoliză, transfer de radicali, (acetilare, glucuronare etc). Medicamentele liposolubile sunt transformate în produşi hidrosolubili, după care se excretă în urină. Alcoolul (etanolul) suferă o oxidare primară la nivelul hepatocitelor. Rata de eliminare depinde de activitatea alcool dehidrogenazei.

21.1.3 Sistemul biliar şi secreţiile biliare

Microtubii biliari pornesc de la nivelul labirintului bazal al polului biliar hepatocitar (*Figura 21.1*) şi se continuă cu conductele intercelulare, intralobulare şi interlobulare, adunându-se în ductul coledoc, din care se desprinde ductul cistic spre colecist. Producţia zilnică de bilă este între 800 - 1000 ml, care se elimină sub o presiune de 26 cm apă. Secreţia biliară se opreşte în cazul în care presiunea intracapsulară hepatică se ridică peste nivelul de 35 cm apă.

În compoziţia bilei predomină apa, în care sunt dizolvaţi electroliţi, sărurile acizilor biliari, bilirubina conjugată, lecitina, colesterolul liber, enzime, imunoglobuline (IgA), tironine etc. Modificarea compoziţiei bilei poate facilita apariţia calculilor biliari.

21.1.3.1 Sinteza acizilor biliari

Acizii biliari sunt substanţe polare, amfipatice, care acţionează ca detergenţi şi emulgatori ai grăsimilor.La nivelul tractului intestinal favorizează absobţia lipidelor şi a vitaminelor liposolubile, funcţie denumită efect hidrotrop. Reduc tensiunea superficială, împreună cu fosfolipide şi monogliceride participă la emulsionarea lipidelor, pregătindu-le pentru procesele de digestie şi absorbţie de la nivel intestinal.

Zilnic se sintetizează aproximativ 300-500 mg de acizi biliari. Sinteza are loc în reticulul endoplasmatic neted al hepatocitelor şi se face din colesterol, prin hidroxilarea acestuia în poziţia 7 şi hidrogenarea la dubla legătură (rezultând 3α, 7α dihidroxicoprostan). Aproximativ două treimi din acest produs se hidroxilează şi în poziţia 12, rezultând în final 3α, 7α şi 12α trihidroxicoprostan. Din aceşti precursori, la nivel mitocondrial au loc procese de oxidare ale lanţului lateral, rezultând acizii biliari primari: acidul chenodeoxicolic şi respectiv acidul colic. Prin conjugare cu glicocolul şi cu taurina se formează acizii glicocolic, taurocolic, respectiv glicochenodeoxicolic şi taurochenodeoxicolic, în bilă aceştia ajungând sub forma sărurilor de Na^+ şi K^+. Sub acţiunea florei microbiene intestinale o parte din acizii biliari primari se vor transforma în acizi biliari secundari (prin dehidroxilare 7α), respectiv din acidul colic va rezulta acidul dezoxicolic, iar din acidul chenodezoxicolic va rezulta acidul litocolic. Acizii biliari terţiari se formează la nivel hepatic prin transformarea unor metaboliţi ai acizilor biliari reabsorbiţi din intestin: acidul ursodeoxicolic, format prin reducerea unui metabolit colanic sau acidul 7- cetocolic, hidroxilat în poziţiile 3 şi 7 fiind un stereoizomer al acidului chenodeoxicolic.

Din intestinul subţire acizii biliari primari se reabsorb împreună cu grăsimile şi ajung înapoi în ficat, zilnic între 100 - 300 mg, de unde se excretă din nou, realizând un circuit enterohepatic. Aproximativ 90-95% din sărurile biliare sunt reabsorbite la nivelul porţiunii terminale a ileonului, printr-un mecanism de transport activ selectiv şi foarte eficient. Sărurile biliare reabsorbite ajung prin intermediul venei porte la nivel hepatic, unde vor fi captate prin intermediul unor receptori specifici, cu afinitate crescută faţă de acizii biliari trihidroxilaţi şi conjugaţi, şi cu afinitate mai redusă faţă de acizii dihidroxilaţi şi neconjugaţi. In mod fiziologic, acizii biliari parcurg de 5-7 ori circuitul enterohepatic, înainte de a fi eliminaţi prin fecale. Acizii biliari se deversează în canaliculele biliare printr-un mecanism de transport activ. În bilă formează micelii cu colesterol şi cu fosfolipide.

Aproximativ 5% din acizii biliari intestinali ajung la nivelul intestinului gros, unde se formează sărurile acizilor dezoxicolic şi litocolic. Litocolatul prezintă o solubilitate scăzută în apă, în cea mai mare parte se elimină prin materiile fecale, aproximativ 1% se absoarbe, în timp ce dezoxicolatul se

Tabelul 21.I. Valorile normale ale acizilor biliari în ser, bilă şi materii fecale *(după Cucuianu M. 2001)*

	Interval de referință	Observații
Ser	0-6 µmoli/L	Acid colic 35% Acid chenodeoxicolic 43% Acid deoxicolic 22%
Bilă din duoden	4,1-30 mmoli/ L	Obținută după un prânz de probă
Materii fecale	0,6-1,3 mmoli/24 ore	Predomină acizii deoxicolic şi litocolic

absoarbe în întregime. Procesul de absobție este pasiv şi nespecific, mai puțin eficient, acționează însă pe toată suprafața colonului.

O alimentație bogată în fibre alimentare, un tranzit intestinal accelerat şi o floră microbiană corespunzătoare a intestinului subțire vor acționa în sensul reducerii cantității de acizi biliari reabsorbiți, eliminându-se zilnic aproximativ 300-500 mg de acizi biliare prin materiile fecale.

21.1.3.2 Reglarea sintezei şi secreției acizilor biliari

Se realizează prin modularea activității enzimelor cheie cu rol în producerea acizilor biliari. HMG CoA (hidroximetilglutaril- coenzim A) reductaza şi 7α colesterol hidroxilaza, sunt reprimate de către o cantitate crescută de acizi biliari reabsorbiți din intestin, iar scăderea reîntoarcerii biliare (drenaj biliar, tranzit intestinal accentuat, administrare de colestiramină) stimulează secreția la nivel hepatic prin dereprimarea lor. Scăderea secreției de bilă (ex. inaniție) şi a motilității intestinale determină o creştere a producției de acizi biliari. Activitatea celor două enzime poate fi stimulată şi pe cale hormonală (hormoni tiroidieni, cortizol) sau de agenți inductori: fenobarbital.

Formarea fluxului biliar apos se realizează prin atragerea apei în canaliculele biliare pe baza unui gradient osmotic – **flux biliar dependent de acizii biliari**. Presiunea osmotică va fi mai mare dacă se formează micelii cu dimensiuni reduse (număr mai mare de particule aflate în soluție), deci gradientul osmotic va favoriza formarea fluxului biliar apos.

În cazurile în care scade cantitatea de acizi biliari, curgerea bilei continuă printr-un **mecanism independent de acizii biliari**, asigurat printr-un proces de transport activ de sodiu în canaliculele biliare, activat de ATPaza Na/K dependentă.

Administrarea de teofilină (inhibitor al fosfodiesterazei) stimulează formarea fluxului biliar apos, iar fenobarbitalul (agent inductor al oxidoreductazelor microsomale) determină o creştere a secreției biliare.

21.1.3.3 Rolul fiziologic al acizilor biliari

Rolul acizilor biliari în metabolismul lipidelor este de a menține lipidele plasmatice în soluție apoasă, înglobându-le în micelii, de a favoriza emulsionarea trigliceridelor şi de a înlesni hidroliza acestora sub acțiunea lipazei pancreatice. Reprezintă un factor indispensabil pentru absorbția vitaminelor liposolubile şi a colesterolului, principala cale de eliminare a colesterolului din organism şi reglează propria sinteză printr-un mecanism de feed-back negativ.

Efectele asupra funcției colonului: limitează reabsorbția apei şi a electroliților la nivelul mucoasei, având efecte de laxativ fiziologic. O cantitate crescută de acizi biliari (în special formele deconjugate şi dehidroxilate), ajunsă la nivelul colonului (de ex. datorită unei reabsorbții scăzute la nivel intestinal) are un efect iritant cu creşterea secreției de apă şi electroliți, determinând apariția unei diarei apoase.

21.1.3.4 Determinarea concentrației fiziologice ale acizilor biliari

Actualmente este mai puțin utilizată, având în vedere limitele foarte largi de variație a concentrației acestor compuşi. Valorile fiziologice ale acizilor biliari din ser, bilă duodenală şi materii fecale sunt redate în *Tabelul 21.I.*

O concentrație a acizilor biliari care nu depăşeşte 4 mmoli/L în sucul duodenal, recoltat după un prânz bogat în grăsimi, se consideră valoare cert scăzută a acizilor biliari.

21.1.3.5 Patologia acizilor biliari

Deficitul de acizi biliari se întâlneşte în cazurile de scădere a reabsorbției biliare sau în afectarea sintezei lor la nivelul ficatului (insuficiență hepatică cronică în special la bolnavii cu ciroză hepatică cu steatoree).

Eliminarea sporită a acizilor biliari prin materiile fecale apare în afecțiunile intestinului subțire:

atrofia mucoasei ileonului, dezvoltarea exagerată a florei microbiene intestinale, rezecţii de ileon, fistule biliare şi administrare de sechestranţi ai colesterolului (colestiramină, colestipol).

În urma deficitului de acizi biliari aproximativ 25% din lipidele alimentare vor fi eliminate prin scaun, afectând grav mai ales absorbţia vitaminelor liposolubile. Acizii biliari nereabsorbiţi vor determina apariţia unei diarei apoase, absorbţia oxalaţilor cu oxalurie şi formarea calculilor urinari.

Deficitul de reabsorbţie a acizilor biliari se poate evidenţia prin testul cu ^{14}C colil- glicină (acid glicocolic, marcat cu carbon radioactiv). Se administrează acid biliar marcat şi se urmăreşte radioactivitatea materiilor fecale. În caz de malabsorbţie a acizilor biliari nivelul radioactivităţii din materiile fecale depăşeşte 80% din cantitatea administrată.

Creşterea nivelului acizilor biliari

Cauza cea mai des întâlnită a creşterii nivelului seric al acizilor biliari este reprezentată de stările de colestază intra- şi extrahepatică. Orice proces de colestază determină creşterea nivelului seric al acizilor biliari de la valorile normale de 0-6 μmoli/L până la concentraţii de peste 100 μmoli/L.

Colestazele extrahepatice sunt determinate de obstrucţia mecanică a coledocului. Întreruperea fluxului biliar duce la creşterea nivelului seric al acizilor biliari şi a celorlalţi compuşi eliminaţi prin bilă: colesterol, fosfolipide, bilirubină conjugată.

Creşterea acizilor biliari în colestazele intrahepatice se realizează prin mecanisme variate. Se consideră anomaliile de hidroxilare şi de transport din hepatocite spre canaliculele biliare, difuzarea lor din canalicule în interstiţiu, cu scăderea fluxului biliar apos şi reducerea secreţiei de acizi biliari. Scăderea fluxului biliar apos determină stagnarea bilei în canaliculele biliare, cu formarea „trombilor biliari" şi lezarea microvililor din canalicule. Pe lângă aceste fenomene trebuie luate în considerare procesele inflamatorii care duc la comprimarea ductelor biliare, lezarea şi fibrozarea lor.

În colestazele intrahepatice, în general în perioadele de debut ale bolii, creşterea în ser a acizilor biliari precede apariţia icterului. În fazele avansate apare şi eliminarea defectuoasă a bilirubinei conjugate, cu dezvoltarea icterului. Alterarea progresivă a funcţiei hepatocitelor se finalizează cu fibrotizarea parenchimului hepatic, dezorganizarea arhitecturii hepatice şi dezvoltarea cirozei biliare.

Rolul acizilor biliari în formarea litiazei biliare: modificarea compoziţiei bilei (scăderea proporţiei de acizi biliari şi/sau fosfolipide), precum şi creşterea concentraţiei în colesterol favorizează precipitarea acestuia şi formarea calculilor biliari. În condiţii normale colesterolul din bilă este menţinut în stare solubilă de către acizi biliari şi lecitină, împreună cu care formează micelii, dar modificări relativ mici ale compoziţiei biliare sunt capabile să declanşeze formarea de cristale, care ulterior se vor transforma în calculi. Aproximativ 10- 20% din populaţia generală prezintă calculi biliari, iar în ţările industrializate 85% din calculi sunt de origine colesterolică. Dacă se reuşeşte creşterea conţinutului sărurilor biliare în bilă, calculii biliari pot fi dizolvaţi.Calculii de bilirubinat de calciu apar dacă bilirubina conjugată se deconjugă sub acţiunea glucuronidazei de origine bacteriană. Bilirubina liberă formează cu calciul bilirubinat de calciu, insolubil în bilă.

Alături de modificarea compoziţiei bilei, în patogeneza litiazei biliare contribuie o serie de alţi factori de risc, cum ar fi: hipotonia vezicii biliare, obezitatea la sexul feminin sau procesele inflamatorii ale căilor biliare.

Toxicitatea acizilor biliari are la bază proprietăţile tensioactive ale acestor substanţe. Astfel participă la patogeneza gastritelor, a ulcerului gastric, a diareilor apoase din disfuncţia ileonului, a pancreatitelor şi la apariţia pruritului la bolnavii cu colestază. În cazul ocluziilor biliare acizii biliari se acumulează în sânge şi pe baza acţiunii lor de detergent, provoacă senzaţia de mâncărime a tegumentelor, reduc tensiunea superficială a urinei eliminate.

Steatorea apare şi în bolile ileonului terminal, sau după îndepărtarea chirurgicală a acestuia: se întrerupe circuitul enterohepatic, iar ficatul nu va fi capabil de a compensa pierderile de săruri biliare, afectând grav metabolismul lipidic.

Patologia pancreatică de origine biliară apare mai ales la bolnavii cu calculi biliari, stricturi coledociene sau spasme ale sfincterului Oddi, când se produce o creştere a presiunii în căile biliare cu refularea bilei în ductul pancreatic. În consecinţă apar leziuni ale acinilor pancreatici, dezorganizarea membranelor celulare, lipoliza ţesutului adipos peripancreatic şi edematierea pancreasului, consecutiv activării fosfolipazei A2 şi a lipazei pancreatice. În cazurile severe se ajunge la activarea proteazelor, autodigestia glandei, dezvoltarea pancreatitei necrotico-hemoragice. Nivele serice permanent crescute ale acizilor biliari (de exemplu în ciroza biliară) par a contribui la instalarea fibrozei pancreatice.

21.1.4 Sistemul vascular hepatic

Sângele venos adunat din regiunea splahnică, conţinând substanţele reabsorbite în intestin este transportat în ficat prin sistemul venei porte. Ramificându-se conform structurii lobulare hepatice, ramurile terminale ale venei porte se sfârşesc în sinusoidele interhepatocelulare. Tot în aceste sinusoide se termină şi ramificaţiile finale ale arterei suprahepatice (vezi *Figura 21.1*). O proporţie de 2/3 din volumul sângelui sinusoidal provine din sistemul portal şi 1/3 din artera suprahepatică. Sinusoidele nu dispun de membrană bazală, sunt delimitate numai de celulele Kupffer şi de hepatocite, care (prin marginile lor în perie) la nivelul polului lor vascular, intră în contact direct cu sângele din sinusoide.

Reglarea circulaţiei hepatice se realizează prin funcţionarea sfincterelor valvulare pre- şi postsinusoidale. Astfel, ficatul reprezintă şi un depozit important de sânge, care în condiţii patologice, poate fi şi blocat (barajul hepatic, descris de Mauthner). În perioadele postprandiale debitul portal scade, dar această scădere este compensată prin creşterea fluxului arterial.

21.1.5 Sistemul monocito-macrofagic

Prin celulele Kuppfer, ficatul dispune de 90% din elementele sistemului monocito-macrofagic al organismului. Sistemul reticulo-endotelial al ficatului intervine în modularea proceselor de reparare şi restructurare la nivelul ţesuturilor lezate. Sistemul reticulo-endotelial hepatic participă la eliminarea agenţilor patogeni şi al diferitelor antigene transportate la nivel hepatic prin intermediul venei porte. Anihilarea antigenelor are loc prin fagocitare de către celulele Kupffer, care produc colagenază, hidrolaze, interleukine, factor de necroză tumorală, etc. Alături de această funcţie importantă de apărare celulară nespecifică, hepatocitele mai produc şi o gamă largă de reactanţi de fază acută, inclusiv antiproteaze. Formarea acestor reactanţi este declanşată prin acţiunea activatoare (derepresoare) a interleukinei-6 (IL-6), eliberată din macrofage. Din această cauză, gradul de apărare al organismului împotriva consecinţelor distructive ale reacţiilor inflamatoare este substanţial condiţionată de starea funcţională a ficatului. Ca urmare, în asemenea cazuri, explorarea funcţiilor hepatice este de o importanţă majoră.Aproximativ jumătate din cantitatea totală de limfă din organism se produce la nivelul ficatului.

21.2 Explorarea de laborator a funcţiilor hepatice

Probele funcţionale hepatice cuprind: testele pentru evidenţierea leziunilor hepatocelulare; testele pentru identificarea tulburărilor funcţionale celulare, inclusiv testele de disproteinemie; testele pentru investigarea epuraţiei pe cale biliară a unor substanţe din plasmă; testele pentru explorarea secreţiei biliare. Nu există nici un test de laborator capabil să aprecieze global funcţia hepatică, sensibilitatea şi specificitatea testelor uzuale fiind limitate. În practică se folosesc combinaţii de teste care, împreună cu datele clinice se utilizează pentru stabilirea diagnosticului şi a prognosticului bolii.

21.2.1 Metode de explorare a leziunilor hepatocelulare

Au ca scop determinarea activităţii C- şi M-enzimelor (GPT, LDH, aldolaza, respectiv GLDH, GOT – vezi *Capitolele 12.3-12.5*), eliberate în urma leziunilor hepatocelulare. În cazul leziunilor grave, necrotice, feritina depozitată în hepatocite pătrunde în sânge şi duce la creşterea marcată a sideremiei. Cea mai însemnată creştere a sideremiei (prin feritină eliberată în exces şi transferina saturată la maxim) se întâlneşte în hemocromatoză. În asemenea cazuri, din cauza funcţiilor deficitare ale hepatocitelor, cantitatea reactanţilor de fază acută în plasmă este semnificativ mai mică.

21.2.2 Teste pentru investigarea tulburărilor funcţionale hepatocitare

21.2.2.1 Investigarea ratei producţiei şi eliberării în sânge a unor enzime de secreţie

Sinteza deficitară a factorilor de coagulare vitamina K dependenţi (PIVKA) în disfuncţiile hepatice, determină diateze hemoragice. Deficitul de vitamină K se poate datora şi unui deficit de absorbţie, aceasta fiind o vitamină liposolubilă, a cărei absorbţie intestinală este afectată de deficitul de acizi biliari. Deficitele de absorbţie pot fi diferenţiate de cele cauzate de lipsa vitaminei K astfel: după determinarea timpului Quick, se administrează pacientului parenteral 10 mg vitamina K. În cazul în care la un interval de 72-96 de ore valoarea timpului Quick devine normală, a fost vorba de o reabsorbţie insuficientă a vitaminei K. Cazul în care diateza hemoragică persistă şi în urma administrării vitaminei K pledează pentru existenţa tulburărilor funcţionale ale hepatocitelor.

În afecțiuni hepatice minore valoarea timpului Quick nu se modifică, dar în cazul hepatitelor acute, toxice sau virale, prelungirea cu mai mult de 5 secunde a timpului Quick denotă o insuficiență hepatică fulminantă.

Gama-glutamil-transpeptidaza se eliberează din endoteliul vascular și biliar lezat. Creșterea activității enzimei semnalizează o microvasculită sau/și colangită. Valori crescute apar și în perioada tardivă (regenerativă) a infarctului miocardic, în mod caracteristic și la bolnavii cu etilism cronic.

21.2.2.2 Investigarea disproteinemiei

Ficatul sintetizează marea majoritate a *proteinelor plasmatice*: α și β globulinele (mai puțin γ globulinele, care sunt sintetizate de către limfocitele B), cum ar fi α1-antitripsina, ceruloplasmina, respectiv transferina și feritina, care pot fi utilizate în diagnosticul și monitorizarea hemocromatozei. În hemo-cromatoză transferina se saturează cu fier și nivelul plasmatic al feritinei crește considerabil.

Țesutul hepatic are capacitatea de a-și suplimenta sinteza proteică de mai multe ori în stările patologice cu pierderi de proteine. Proteinograma de tipul inflamației acute, subacute și cronice, cu scăderea cantității albuminelor și creșterea alfa, beta și gama-globulinelor policlonale (cu baza largă), este caracteristică mai ales în ciroza hepatică, dar și în alte stări patologice caracterizate prin distrucție tisulară. În serul bolnavilor cu hepatită B apare antigenul viral B de suprafață (AgHBs), iar la cei cu tumoră hepatică primitivă, antigenul asociat cancerului, α1 fetoproteina. Probele de disproteinemie, utilizate anterior ca probe hepatice, din cauza caracterului lor global, lipsit de specificitate, nu se mai folosesc pentru scopuri diagnostice.

Albumina plasmatică se sintetizează în cantitate de 10-15 g zilnic de către ficat, reprezentând aproximativ 3% din cantitatea totală de albumină a organismului, iar timpul său de înjumătățire este de 20 de zile, din care cauză afecțiunile hepatice acute nu se reflectă prin scăderea albuminemiei.

Imunoglobulinele serice cresc cantitativ în marea majoritate al afecțiunilor hepatice cronice. Cauza acestei creșteri o constituie afectarea funcțională a sistemului monocito-macrofagic sau șuntarea acestui sistem prin șunturile porto-cave, când ficatul nu-și mai poate îndeplini funcția de filtrare a sângelui. Bacteriemia, care apare în mod fiziologic în sângele transportat de către vena portă dinspre colon, produce o stimulare antigenică cronică a țesuturilor limfatice extrahepatice, ceea ce va determina apariția hiper γ-globulinemiei cronice.

Nivelul *globulinelor plasmatice* crește moderat în hepatitele acute și prezintă o creștere marcată în hepatitele cronice active, îndeosebi în formele autoimune.

Creșterea nivelelor imunoglobulinelor plasmatice este puțin specifică, dar ciroza biliară primară se caracterizează prin creșterea fracțiunii IgM. În hepatitele de origine etilică se întâlnesc nivele crescute de IgA, iar hepatitele cronice active se caracterizează prin nivele de IgG crescute.

Evidențierea unor *anticorpi* poate avea rol diagnostic în unele cazuri, cum ar fi hepatitele virale și mononucleoza infecțioasă.

Autoanticorpii antimitocondriali apar în mod constant în ciroza biliară primitivă, ei putând fi evidențiați în titru crescut la peste 95% din bolnavii cu ciroza biliară primară. Acești autoanticorpi pot fi evidențiați și la bolnavii cu hepatită cronică activă, hepatită toxică de origine medicamentoasă și în colagenoze. Nu apar în obstrucțiile mecanice ale căilor hepatice sau în colangita primară sclerotizantă, având astfel un rol important în diagnosticul diferențial al acestor boli.

În hepatitele autoimune cronice pot apărea anticorpi formați față de componente ale mușchilor netezi: anticorpi anti-actină sau anticorpi antimicrozomiali. Evidențierea și dozarea acestor autoanticorpi nu are valoare diagnostică și nu contribuie în mod fundamental la stabilirea diagnosticului.

α-fetoproteina (AFP) este o proteină oncofetală, se sintetizează în ficatul fetal, nivelul ei plasmatic se normalizează la sfârșitul primului an de viață (<20 ng/mL). În carcinoamele hepatocelulare atinge valori considerabile. Nivelul AFP se corelează cu volumul tumorii, și poate fi folosit în scop de screening în grupurile la risc. Există câteva afecțiuni care se caracterizează prin valori crescute ale AFP (peste 400 ng/mL): teratocarcinoame embrionare, hepatoblastom, rar în metastazele tumorilor tractului gastro-intestinal și în unele forme ale colangiocarcinoamelor.

În hepatitele fulminante poate depăși nivelul de 1000 ng/mL, în hepatitele acute și cronice se ating nivele mai scăzute, de aproximativ 100-400 ng/mL, care denotă fenomenul de regenerare a hepatocitelor.

21.2.2.3 Investigarea dislipidemiei

Creșterea VLDL (triglicéridelor endogene) și scăderea HDL este un semn al inflamației vasculo-

biliare. În stări toxice (etilism), se reduce capacitatea hepatocitelor de a mobiliza grăsimile, ducând la manifestarea steatozei hepatice. Scăderea raportului între cantitatea colesterolului esterificat și liber (normal 7:3) semnalează o tulburare a funcțiilor hepatocitare. În stări de colestază poate apare în ser o lipoproteină patologică, bogată în fosfolipide: lipoproteina X (LP-X), cu direcție de migrare electroforetică spre catod.

21.2.2.4 Toleranța la glucide și derivații acestora

Testul de toleranță la glucoza administrată oral se pozitivează, iar proba de încărcare cu galactoză devine pozitivă: în urina recoltată timp de 5 ore după consumul a 40 g galactoză, se elimină o cantitate mult mai mare de galactoză netransformată în glucoză (peste 3 g).

Capacitatea hepatocitelor de a transforma în glucoză acidul lactic rezultat în glicoliza anaerobă, este limitată. La bolnavi cu insuficiență hepatică, lactacidemia crescută persistă în funcție de gravitatea insuficienței hepatice.

21.2.2.5 Explorarea capacității de detoxifiere a hepatocitelor

În acest scop se folosește proba formării acidului hipuric: pacientul ingeră 6 g de benzoat de sodiu. În urina eliminată la 4 ore după administrarea substanței, se determină cantitatea acidului hipuric, care în condiții normale trebuie să depășească valoarea limită de 3,5 g. În cazul funcțiilor hepatice alterate, se elimină o cantitate redusă, proporțională cu gravitatea leziunilor. Proba pozitivă se poate normaliza în urma administrării alături de benzoatul de sodiu a glicinei, necesară pentru conjugarea cu acidul benzoic.

Consecința cea mai gravă a insuficienței hepatice totale o constituie scăderea detoxifierii amoniacului prin afectarea ureogenezei. În condiții normale, majoritatea amoniacului rezultat în periferie este detoxificat la locul de formare (prin interacțiunea cu acidul glutamic rezultând glutamina); excedentul intră în vena portă și este preluat de către ficat. Ca urmare, în insuficiența hepatică crește rapid cantitatea amoniacului în sânge. Sistemul nervos central este foarte sensibil la efectele toxice ale acestei substanțe, deoarece printr-o difuziune neionică, amoniacul traversează direct membranele neuronilor. În condiții normale, amoniacul plasmatic variază între 10 - 70 μmol/L (17- 120 μg/dL). La valori de peste 75 μmol/L (130 μg/dL), apar semnele comei hepatice, greu reductibilă (de cele mai multe ori lasă sechele nervoase permanente - encefalopatia hepatică).

21.2.3 Teste pentru explorarea epurării hepatice a unor substanțe din plasmă

Unele substanțe formate și eliberate în țesuturile extrahepatice, ca fosfataza alcalină în țesutul osos și intestinal sau introduse în organism pentru scopuri diagnostice (bromsulfonftaleina = BSP), sunt extrase din sânge de către hepatocite și se excretă în bilă. Determinarea activității serice a fosfatazei alcaline indică gravitatea unei obstrucții biliare. Proba cu BSP se folosește de asemenea pentru investigarea capacității de extracție și epurație a hepatocitelor: dintr-o soluție sterilă de BSP se injectează i.v. 5 mg/kg corp. La 45 minute după administrare, se determină cantitatea de BSP rămasă în sânge. În cazul unei extracții hepatice normale, cantitatea BSP reținută în sânge după 45 de minute, este mai mică decât 5 % din cantitatea totală administrată. Valori de peste 5 % pledează pentru scăderea gradului de extracție hepatică a substanței administrate.

Alte teste care explorează capacitatea de epurare a ficatului: testul de expirare a ^{14}C-aminopirinei (testul demetilării citocrom P450-dependente), și capacitatea de eliminarea a galactozei, care este un test de fosforilare a galactozei, sau testul formării de monoetilglicinxilidid (MEGX) după administrare de lidocaină intra venos *in bolus*.

Dozarea produșilor de conjugare ai bilirubinei în plasmă, cum ar fi dozarea α-izoenzimei glutation-s-transferazei plasmatice pare a fi un test mai sensibil și mai specific al leziunilor hepatice decât dozarea activității aminotransferazelor.

21.2.4 Teste pentru explorarea secreției biliare

Cantitatea, aspectul și compoziția chimică, celulară și microbiană-parazitară a bilei se examinează cu ajutorul tubajului duodenal: prin intermediul sondei Einhorn, introduse în duoden, se recoltează bila A existentă (secrețiile duodenale), bila B (cistică) obținută în urma provocării contracției vezicii biliare cu sulfat de magneziu și bila C (hepatică) secretată după golirea vezicii biliare. Fracțiunile recoltate se examinează biochimic și

microscopic; cele obținute în condiții sterile, se examinează și din punct de vedere microbiologic.

Hepatocitele dispun de o capacitate funcțională foarte mare. Păstrarea numai a 10 % din capacitatea lor funcțională totală poate fi suficientă pentru asigurarea necesităților metabolice de bază ale organismului. Din acest motiv, în vederea aprecierii stării funcționale reale a ficatului, este necesară explorarea mai multor parametri.

Secreția acizilor biliari: acizii biliari reabsorbiți din intestin și necaptați la nivel hepatic ajung în circulația sistemică, nivelele serice prezentând o evoluție paralelă cu gravitatea insuficienței hepatice. În insuficiența hepatică cresc mai mult acizii biliari secundari, în timp ce în colestază cresc acizii biliari primari. Diferențierea celor două tipuri de acizi biliari presupune efectuarea unor investigații cromatografice.

21.3 Patochimia icterelor

21.3.1 Pigmenții biliari

Bilirubina rezultă prin degradarea hemului din molecula de hemoglobină, eliberată din hematiile îndepărtate din circulație de către elementele sistemului reticulo-endotelial (SRE) (*Figura 21.2a*). Fierul conținut în hem va fi refolosit, iar inelul tetrapirolic va fi degradat de hemoxigenază (un citocrom P450), trecând prin produsul intermediar biliverdină (redus de către biliverdin-reductază) până la bilirubină. Din cantitatea de 250-350 mg de bilirubină produsă pe zi (în primul rând în urma degradării hematiilor îmbătrânite), 15% provine din descompunerea enzimelor heminice (catalaza, peroxidazele, citocromii, triptofan-pirolaza etc.), respectiv din distrugerea eritroblaștilor imaturi în măduva roșie.

Insolubilă în apă, bilirubina "liberă", neconjugată se transportă în sânge sub formă legată de albumină, formă în care nu poate traversa bariera hematoencefalică și nu se excretă în urină (*Figura 21.2b*). Această formă se numește bilirubină indirectă (neconjugată), deoarece reacționează la diazotare numai în urma eliberării prealabile de pe albumină.

Hepatocitele preiau bilirubina legată de albumină din sângele sinusoidelor, prin fixarea ei pe 2 proteine de transport intracelular (Y și Z). Aceste proteine transportă bilirubina prin canalele reticulului endoplasmatic neted, în interiorul cărora are loc conjugarea enzimatică a pigmentului cu câte 2 molecule de acid glucuronic, catalizată de UDP– glucuronil – transferază. În urma glucuronării, bilirubina devine solubilă în apă și se excretă în canaliculele biliare și astfel ajunge în intestinul subțire. Excreția bilirubinei în canaliculele biliare este etapa limitantă de viteză a metabolismului bilirubinei. Această fracțiune al bilirubinei se numește bilirubină directă (conjugată), deoarece reacția de diazotare are loc direct. În intestinul subțire, sub acțiunea reducătoare a florei bacteriene, bilirubina se transformă succesiv în mezobilină, apoi în mezobilingen (o substanță incoloră numită impropriu și urobilinogen – Ubg) și în final în stercobilinogen, care se elimină prin materiile fecale sub forma compusului oxidat – Stercobilină (principala formă de eliminarea din organism a produșilor de catabolism ai bilirubinei, care imprimă scaunului culoarea brună).

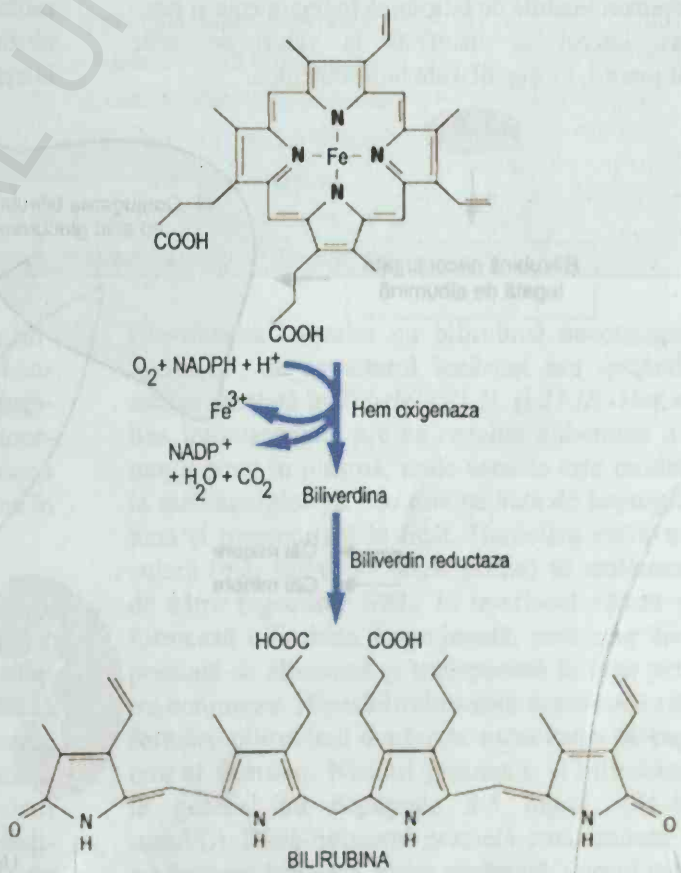


Figura 21.2 a. Schema reacțiilor de formare a bilirubinei

O parte a urobilinogenului se absoarbe din intestin și ajunge în circulația portală, parcurgând astfel circuitul enterohepatic. Ficatul nu captează însă întreaga cantitate de urobilinogen: o mică parte ajunge în circulația sistemică și se excretă în urină. Urobilinogenul se elimină în urină, într-o cantitate care nu depășește 3,5 - 4 mg/zi.

În condiții normale, aproximativ 95% din bilirubina plasmatică se găsește sub formă neconjugată, care nu se filtrează la nivel glomerular (fiind legată de albumină), deci nu apare în urina persoanelor sănătoase. Bilirubinuria reflectă creșterea concentrației plasmatice a bilirubinei conjugate, constituind un semn patologic.

Afecțiunile hepatice nu sunt în mod obligatoriu însoțite de hiperbilirubinemie (de exemplu în cirozele hepatice compensate, bilirubina poate fi normală) și nu reflectă întotdeauna o afecțiune hepatică (putând fi cauzată de un carcinom de pancreas în stadiu avansat).

Plasma normală conține între 8,6 - 21 μmol/L (0,5-1,2 mg/dL) bilirubină. Valorile moderat crescute (25-50 μmol/L, respectiv 1,5-3 mg/dL) ale bilirubinemiei determină subicter, deoarece nu duc la depuneri vizibile de bilirubină în tegumente și țesuturi. Icterul se manifestă la valori de peste 50 μmol/L (3 mg /dL) ale bilirubinemiei.

21.3.2 Clasificarea icterelor

Icterele sunt cauzate de creșterea concentrației de bilirubină din plasmă, manifestată prin apariția unei colorații gălbui la nivelul pielii, a sclerelor și la nivelul țesuturilor. Această colorație devine vizibilă prima dată la nivelul sclerelor, la lumină naturală, dacă nivelul bilirubinei plasmatice depășește 2-2,5 mg/dL (34-43 μmol/L).

Clasificarea cea mai frecvent utilizată a icterelor este aceea pe baza mecanismului de apariție:

- Ictere prehepatice (creșterea producției de bilirubină, cu predominența bilirubinei neconjugate);
- Ictere hepatice (datorate capacității hepatice scăzute de a prelua, conjuga sau elimina bilirubina - în care atât bilirubina neconjugată, cât și cea conjugată sunt crescute);
- Ictere posthepatice (datorate obstrucțiilor pe căile biliare - cu predominența bilirubinei conjugate).

O altă clasificare a icterelor ia în considerare tipul de bilirubină prezentă în cantitate crescută în plasmă. Astfel se vorbește de hiperbilirubinemie neconjugată, hiper-bilirubinemie conjugată și mixtă. În cele mai multe cazuri, se dezvoltă o hiperbilirubinemie mixtă, deoarece afecțiunile hepatice și obstrucția căilor biliare sunt manifestări ale aceleiași boli. Evidențierea în laborator a fracțiunilor

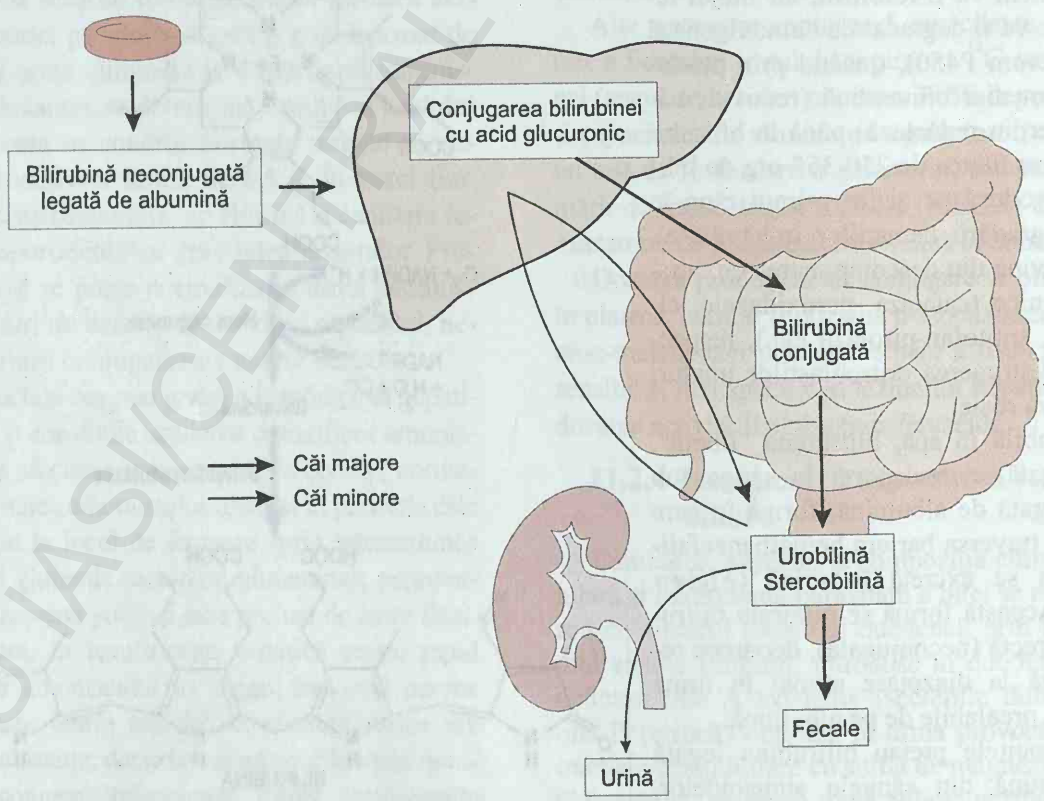


Figura 21.2 b. Formarea și eliminarea fiziologică a bilirubinei

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 21.II. Cauzele hiperbilirubinemiilor dobândite (hiperbilirubinemii neconjugate).

Cauze	Patologie
Producție crescută	Anemii hemolitice: anemii hemolitice autoimune (lupus eritematos sistemic, droguri)
	Eritropoeză inefectivă: deficit de vitamină B_{12} și folați
Captare afectată	Droguri: rifampicină, substanțe de contrast
	Fiziologic: icterul nou-născutului
	Hepatită virală
	Boli cronice hepatice
	Șunt portocaval
Conjugare defectuoasă	Icterul fiziologic al nou-născutului
	Incompatibilitate ABO
	Icterul la laptele de mamă
	Hepatite virale
Hepatopatii cronice	Defecte în sistemul de transport intrahepatocitar sau canalicular
	Hepatite virale
	Fibroză cistică
	Colestază benignă din timpul sacrinii
	Droguri
	Defecte la nivelul ducturilor biliare interlobulare/septale
	Atrezie biliară intrahepatică
	Ciroză biliară primară
	Colangită sclerozantă primară
	Atrezie biliară extrahepatică
	Calculi în ductul biliar comun
	Carcinom al vezicii biliare
	Colangiocarcinom
	Carcinom al ductului biliar comun sau al ampulei Vater
	Carcinom de cap de pancreas

bilirubinei (bilirubină directă și indirectă) este importantă în vederea diagnosticului diferențial al bolilor care evoluează cu hiperbilirubinemie conjugată sau neconjugată. În cazul afecțiunilor hepatocelulare și a celor cu obstrucție biliară cuantificarea celor două fracțiuni ale bilirubinei nu contribuie în mod esențial la stabilirea diagnosticului.

21.3.2.1 Hiperbilirubinemiile neconjugate

Dacă hiperbilirubinemia este cauzată de creșterea bilirubinei neconjugate, bilirubina totală rareori depășește 100 µmoli/L (5,84 mg/dL) la adult (*Figura 21.3*). Cauzele cele mai frecvente ale hiperbilirubinemiilor neconjugate sunt **stările de hemoliză** (afecțiuni imunologice, hematii sau hemoglobine cu structură anormală, hemoliza extravasculară) și **anomaliile genetice ale preluării hepatice a bilirubinei neconjugate**. Clasificarea icterelor cu bilirubină neconjugată în funcție de caracterul înnăscut sau dobândit este prezentată în *Tabelele 21.II.* și *21.III.* Hemoliza intravasculară are ca rezultat eliberarea hemoglobinei în plasmă, unde aceasta este oxidată la methemoglobină sau este captată de haptoglobină și transportată la ficat. Hemoliza extravasculară (mai frecventă decât prima) se realizează de către fagocitele SRE, în interiorul cărora se formează bilirubina neconjugată, care este apoi preluată de albumină și transportată la ficat pentru conjugare. Hiperbilirubinemia apare dacă rata formării bilirubinei depășește capacitatea de captare al ficatului. Nivelul plasmatic al bilirubinei în general nu depășește 3-5 mg/dL (51-86 µmol/L). Dacă bolnavul prezintă concomitent și o afecțiune hepatică, chiar moderată, icterul va fi mult mai pronunțat, iar în plasmă apar creșteri

Tabel 21.III. Cauzele hiperbilirubinemiilor ereditare (hiperbilirubinemii neconjugate).

Cauze	Patologie
Producție crescută	Anemii hemolitice ereditare: anemii hemolitice extravasculare (sferocitoză congenitală, *sickle cell disease*) Eritropoeză inefectivă: beta-talasemie severă
Captare-conjugare defectuoasă	Sindrom Gilbert
Conjugare defectuoasă	Sindrom Gilbert, sindrom Crigler-Najjar
Hiperbilirubinemie conjugată	Sindrom Dubin-Johnson, sindrom Rotor

ale nivelelor de bilirubină conjugată și neconjugată, deoarece este afectată și excreția bilirubinei în canaliculele biliare.

Icterul tranzitoriu al nou-născutului apare în mod fiziologic în zilele 2-4 după naștere, datorită imaturității sistemului enzimatic hepatic, de conjugare a bilirubinei (predomină forma indirectă a bilirubinei) și durează 8-10 zile. În mod normal concentrația bilirubinei nu depășește 8-10 mg/dL (125-160 μmol/L) – poate fi mai sever însă, la copiii născuți prematur. Valorile crescute ale bilirubinei indirecte pot deveni periculoase (de obicei dacă depășesc 12-15 mg/dL) datorită faptului că bilirubina neconjugată (liposolubilă) este toxică pentru creier (kernicter). Fototerapia (UV) transformă bilirubina în fotoizomeri nontoxici, hidrosolubili, care pot fi eliminați prin bilă. Icterul precoce al nou-născutului (în primele 24 ore) sau tardiv (după ziua a 10-a de la naștere) sunt patologice, putând fi cauzate de stări de hemoliză patologice sau de defecte ale căilor biliare.

Anomaliile genetice ale preluării și conjugării bilirubinei de către ficat, sunt prezente la aproximativ 5% din populația generală.

Icterul la laptele matern (sindromul Lucey-Driscoll): apare după vârsta de 2-3 săptămâni la nou-născuți sănătoși, alăptați cu lapte matern. Printre factorii declanșatori se consideră: substanțe care influențează negativ excreția de bilirubină, activitatea scăzută a glucuronil transferazei și

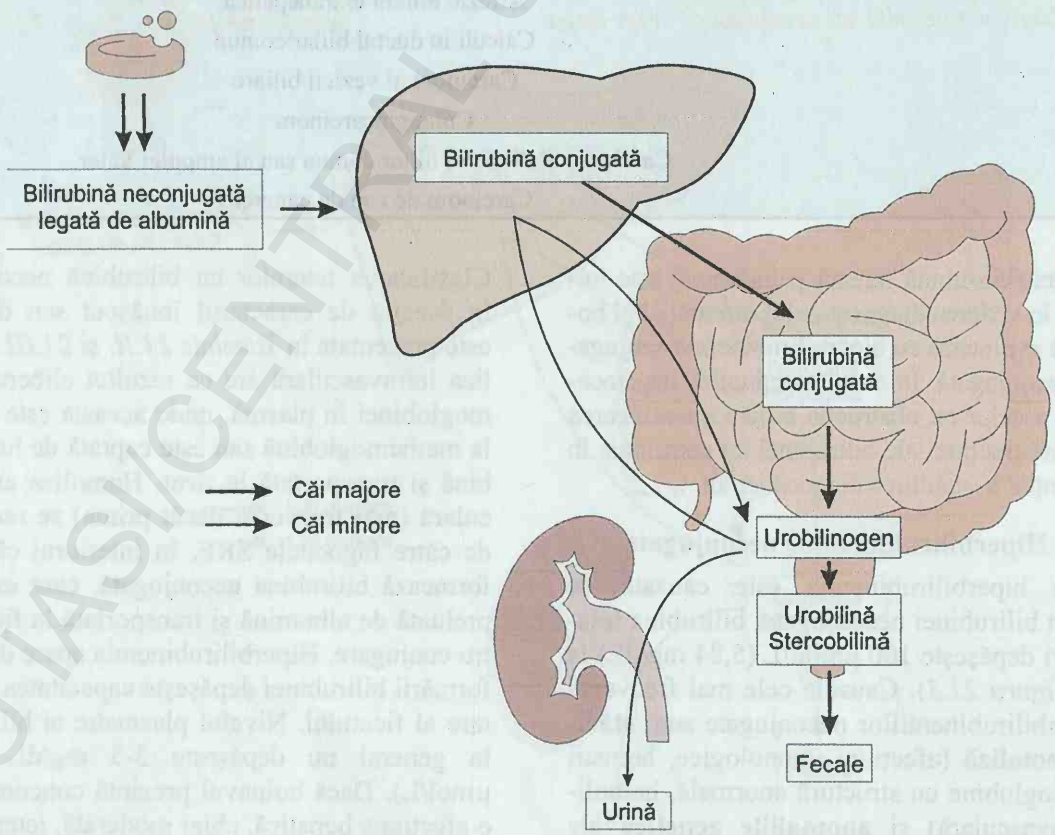


Figura 21.3. Icterul prehepatic – hemolitic

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prezența hormonilor steroidici în laptele matern. Starea generală a copiilor afectați este de obicei bună, răspunde favorabil la suspendarea alăptării sau înlocuirea laptelui de mamă.

Sindromul Gilbert este o afecțiune cu importanță clinică minoră, care se datorează unui deficit funcțional ușor al glucuronil transferazei. Simptomul principal îl constituie hiper-bilirubinemia indirectă moderată, care de multe ori impune diferențierea de o hepatită cronică. În cele mai multe cazuri este descoperită la adulți tineri, care se prezintă la consultație medicală pentru acuze necaracteristice. Se transmite autozomal recesiv, fiind cea mai frecventă cauză ereditară de hiperbilirubinemie indirectă / neconjugată.

Sindromul Crigler-Najjar are la bază un deficit genetic al UDP-glucuronil transferazei, transmis autozomal recesiv. Se descriu două forme: tipul I (deficit total), cu hiper-bilirubinemie gravă. Bolnavii suferind de această formă decedează de obicei în primul an de viață prin icter nuclear. În tipul II (deficit parțial, cu scăderea semnificativă a activității enzimatice), hiperbilirubinemia este mai puțin gravă, <20 mg/dL (<342 μmol/L). Acest tip de icter poate fi tratat prin administrare de fenobarbital, deoarece inducția enzimatică crește activitatea enzimei. În general, boala evoluează fără afectare neurologică.

Hiperbilirubinemia de șunt primară este o afecțiune rară, familială, benignă.

21.3.2.2 Hiperbilirubinemiile mixte conjugate și neconjugate

Sunt cauzate de disfuncții hepatocitare generalizate, în care apar și alte modificări biochimice și serologice caracteristice hepatolizei (*Figura 21.4*).

21.3.2.3 Hiperbilirubinemiile conjugate

Sunt cauzate de eliberarea în circulația sanguină a bilirubinei din hepatocitele afectate sau din canaliculele sistemului biliar, datorită unei obstrucții biliare. Mecanismele care duc la apariția colestazei sunt multiple: afectarea funcțională a enzimelor hidrolitice microzomale, scăderea activității ATP-azei Na-K dependente, necesare menținerii fluxului biliar din canaliculele biliare, modificarea structurii membranei celulare și a vîscozității acestor membrane, afectarea funcției microfilamentelor și resorbția accentuată a componenetetelor bilei. În obstrucțiile biliare parțiale sau totale bilirubina nu ajunge în intestin, nu se formează stercobilinogen, iar

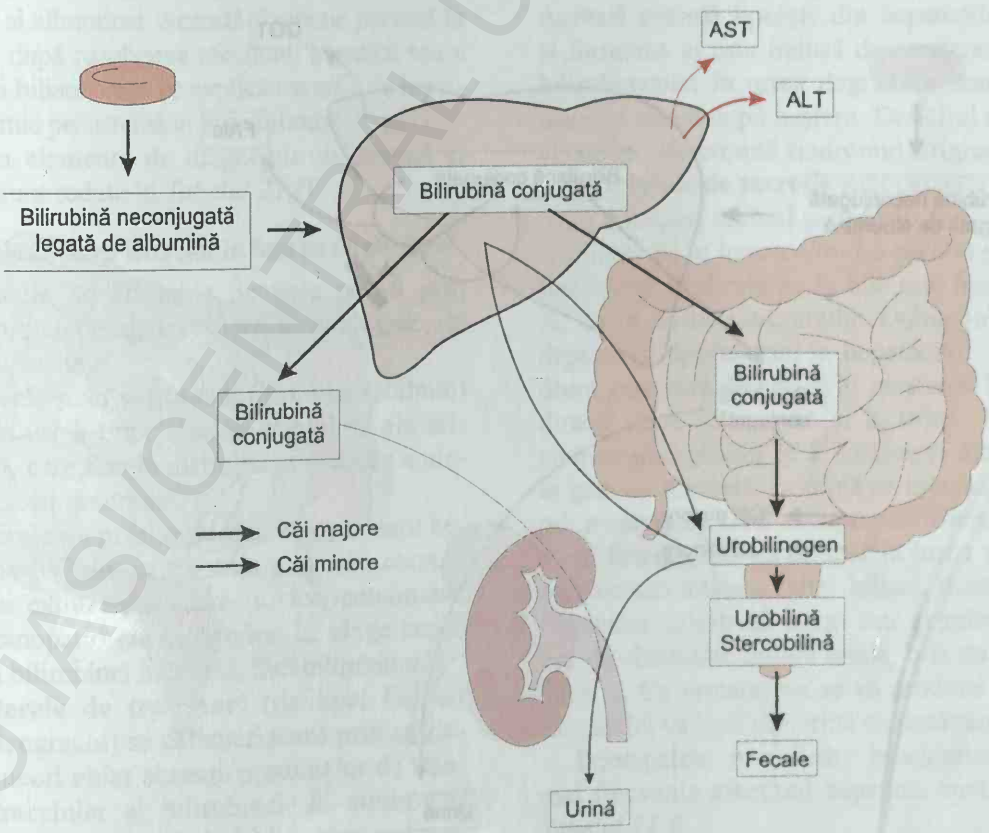


Figura 21.4. Icterul hepatic

scaunul va avea o culoare deschisă (*Figura 21.5*). Se dezvoltă o hiperbilirubinemie mixtă, bilirubina conjugată se evidențiază în urină în cantitate crescută. Scaunul poate devini hipocolic, deoarece în intestin ajunge o cantitate scăzută de bilirubină. Lipsa acizilor biliari afectează absorbția lipidelor și a vitaminei K, determinând steatoree și hipoprotrombinemie. Stările de colestază îndelungată pot contribui la dezvoltarea osteoporozei sau a osteomalaciei prin afectarea absorbției calciului și a vitaminei D. Hiperlipidemia plasmatică este cauzată de lipsa eliminării colesterolului și a fosfolipidelor, respectiv de creșterea sintezei hepatice a colesterolului și esterificarea colesterolului în plasmă. În plasmă se regăsește fracțiunea lipoproteinei-X, o fracțiune patologică de LDL. Bilirubina conjugată va fi excretată în urină, conferind urinii o culoare brună-portocalie caracteristică.

Hiperbilirubinemiile conjugate necolestatice

Sindromul Dubin-Johnson se produce datorită incapacității de secreție a bilirubinei conjugate din microzomii hepatici în canaliculele biliare. Secreția acizilor biliari nu este afectată, în timp ce secreția unor anioni organici și a bilirubinei este afectată, aceasta din urmă depunându-se intrahepatocitar. Se transmite autosomal recesiv și determină apariția unui icter fără acuze clinice.

Sindromul Rotor se aseamănă cu sindromul Dubin-Johnson, dar evoluează fără depunere de pigment. Dozarea fracțiunii conjugate și a celei neconjugate este deosebit de importantă în special în diagnosticul diferențial al icterelor neonatale.

Dacă nivelul bilirubinemiei plasmatice nu depășește 100 μmol/L (5,89 mg/dL) și celelalte teste funcționale hepatice au valori normale, se consideră că avem de a face cu o hiper-bilirubinemie neconjugată, ceea ce trebuie confirmată și prin dozarea bilirubinei urinare (în această situație, bilirubina urinară trebuie să fie absentă).

Rolul determinărilor uzuale de laborator în stabilirea diagnosticului este limitat. Este caracteristică creșterea activității fosfatazei alcaline (sinteză hepatică accentuată și excreție redusă), nivelul plasmatic al bilirubinei reflectă mai mult gravitatea afecțiunii, dar nu oferă informații în legătură cu etiologia bolii. Activitatea aminotransferazelor depinde de etiologie, nivelele plasmatice sunt în general moderat crescute. Creșteri exprimate ale activității acestor enzime se corelează cu prezența unor afecțiuni hepatocelulare, dar pot fi cauzate și

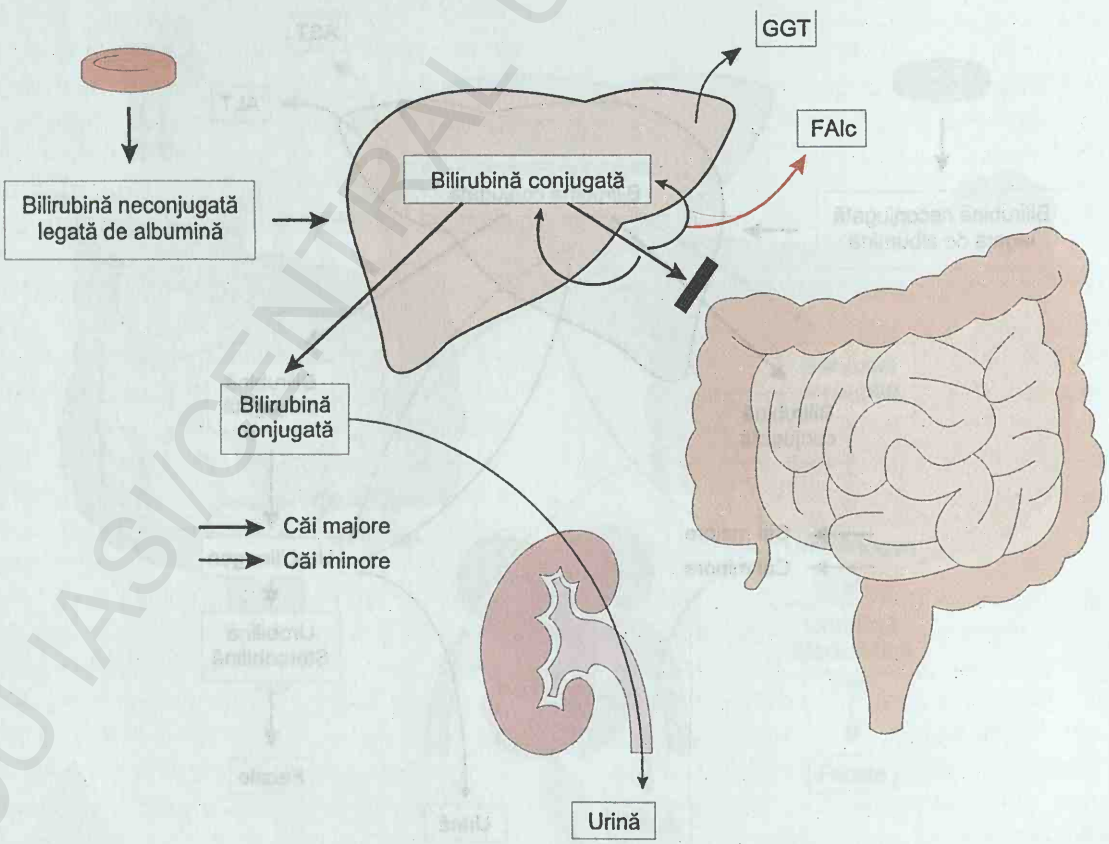


Figura 21.5. Icterul posthepatic

Tabel 21.IV. Diagnosticul diferențial al icterelor

Parametru / Stare	Ser		Urină		Fecale	ALT	FAlc
	Bi totală	Bi conj	Bi	Ubg	Culoare		
Normal	0,5-1,2 mg/dL	0-0,2 mg/dL	negativ	0,5-3,5 mg/zi	brună	< 39 U/L	< 190 U/L
Icter prehepatic	↑	normal	negativ	↑	brună	normal	normal
Ictere hepatice							
• **Afecțiuni hepatocelulare**	↑	↑	pozitiv	↓/normal	brun deschis	↑↑	↑
• **S. Gilbert**	↑	normal	negativ	↓/normal	brună	normal	normal
• **S. Crigler-Najjar**	↑	↓	negativ	↓	brun deschis	normal	normal
• **S. Dubin - Johnson**	↑	↑	pozitiv	↓/normal	brun deschis	normal	normal
Icter posthepatic	↑	↑	pozitiv	↓/absent	deschis/ decolorat	normal	↑↑

de colestază extrahepatică (de exemplu colestază acută de origine litiazică.)

Creşterea concomitentă a amilazei pancreatice denotă colestază extrahepatică.

La bolnavii cu hiperbilirubinemie conjugată persistentă poate fi pusă în evidență o a treia fracțiune a bilirubinei, cea legată de albumină prin legături covalente (bilirubină-δ), cu timp de înjumătățire similar cu cel al albuminei. Această fracțiune persistă în plasmă şi după rezolvarea afecțiunii hepatice sau a obstrucției biliare, ceea ce explică cazurile de hiperbilirubinemie persistentă în lipsa bilirubinuriei.

Câteva elemente de diagnostic diferențial al icterelor sunt redate în *Tabelul 21.IV.*

21.3.2.4 Clasificarea icterelor în funcție de etiologie

În funcție de etiologie, icterele pot fi prin şunt, de producție, de transport, de conjugare, de secreție şi de stază.

1.**Icterele prin şunt** (sunt forme rar întâlnite) apărute în urma unor afectări medulare ale eritropoiezei, care duc la distrugerea precoce a elementelor roşii imature.

2. **Icterele de producție** apar în urma unor hemolize masive, din cauza unor anomalii corpusculare sau extracorpusculare (toxice, autoimune, hemoglobinopatii) ale hematiilor. În sânge creşte cantitatea bilirubinei indirecte, fără bilirubinurie.

3. **Icterele de transport** (de tipul Gilbert sau Meulengracht) se caracterizează prin scăderea sau uneori chiar absența proteinelor de transport intracelular al bilirubinei. În sindromul Gilbert creşte în primul rând bilirubina indirectă, probele funcționale hepatice sunt negative, în urină nu apare bilirubină, ceea ce o face uşor diferențiabilă de o hepatită acută. Lipsa anemiei şi a reticulocitozei fac diferențierea față de hemoliza intravasculară. Imaginea histologică a ficatului este normală.

4. **Icterele de conjugare** se manifestă din cauza absenței uridil – glucuronil – transferazei. Această enzimă lipseşte din hepatocitele fătului şi formarea ei este indusă de creşterea bruscă a bilirubinemiei în urma degradării masive a hematiilor fetale după naştere. Deficitul congenital al enzimei determină sindromul Crigler-Najjar.

5. **Icterele de secreție** sunt caracterizate printr-un transport normal şi printr-o conjugare bună a bilirubinei în hepatocite. La nivelul polului biliar excreția bilirubinei în bilă este însă deficitară, ca în cazul sindromului Dubin-Johnson (cu depunerea lipofuscinei în hepatocite). Acest sindrom este caracterizat prin creşterea bilirubinei directe, care se excretă şi în urină. Activitatea aminotransferazelor şi a fosfatazei alcaline este în general normală. În urină se inversează raportul izomerilor I şi III al coproporfirinei.

6. **Icterele de stază** apar în urma obstrucției parțiale sau totale a căilor biliare, ducând la manifestarea colestazei intra- sau extrahepatice. În caz de obstrucție biliară totală, bila nu ajunge în intestin. Ca urmare, nu se va produce nici Ubg, care astfel va lipsi din urină cu desăvârşire.

Principalele modificări biochimice în cele mai frecvente afecțiuni hepatice, sunt redate în *Tabelul 21.V.*

Tabel 21.V. Modificarea unor parametri biochimici în diverse afecțiuni hepatice

Boala / Test	Hepatită acută	Hepatită cronică activă	Hepatită cronică persistentă	Ciroză	Hepatită toxică alcoolică	Colestază	Malignități și infiltrații
Bilirubină	N/↑↑	N/↑	N	N/↑	↑/↑↑	↑/↑↑↑	N
Urobilinogen	↑↑↑	N/↑	↑	N	↑↑	Absent	N/↑
Transaminaze	↑↑↑	↑↑	↑	N/↑	↑↑/↑↑↑	N/↑	N/↑
F Alc	↑	N[&]	N	N/↑↑	N/↑	↑↑↑	↑↑
γ -GT	↑	N/↑	N/↑	N/↑↑	↑↑	↑↑↑	N/↑
Albumină	N	N/↓	N	N/↓	N/↓	N	N/↓
γ-Globuline	N	↑↑	↑↑	↑↑	N	N	N
Timp Quick	N/↑*	N/↑	N	N/↑*	N/↑	N/↑[#]	N

& Poate fi crescută dacă e prezentă ciroza
** Nu se corectează cu vitamina K parenteral*
 # Corectabil cu vitamina K parenteral

21.4 Prezentări de caz

21.4.1 Ciroză biliară primitivă cu icter colestatic

Femeie în vârstă de 38 ani se prezintă la serviciul de gastroenterologie cu stare generală bună, dar cu prurit generalizat, de intensitate crescândă în ultimele 12 luni. Nu consumă alcool, anamnestic nu se evidențiază contact cu bolnavi cu hepatită, intervenții medicale, călătorie în străinătate.

Rezultatele examinărilor de laborator în ser:

- Proteine totale 90 g/L
- Albumină 30 g/L
- Bilirubină 15 mg/dL
- Fosfatază alcalină 500U/L
- AST 100 U/L
- GGT 230 U/L

Interpretarea cazului:

Creșterea activității fosfatazei alcaline denotă un icter colestatic, nivelul scăzut al albuminei plasmatice sugerează afectarea funcției hepatice. Hiperproteinemia plasmatică (din care 60 g/L este reprezentat de globuline) ridică suspiciunea de boală autoimună. Diagnosticul de ciroză biliară primitivă a fost confirmată prin evidențierea unui titru crescut de imunoglobuline de tip IgM, a prezenței anticorpilor antimitocondriali și prin examen histologic al țesutului bioptic hepatic.

21.4.2 Sindrom Gilbert

După un episod recent de gripă, un tânăr se prezintă la medicul de familie cu un icter moderat. Pentru a exclude o eventuală hepatită acută se recoltează sânge pentru examinări de laborator.

Rezultatele examinărilor de laborator în ser:

- Bilirubină 3,5mg/dL
- Fosfatază alcalină 70 U/L
- AST 34 U/L
- Hemoglobină 15 g/L
- Reticulocite 1%
- Urină:
- Bilirubină, UBG normal

Interpretarea cazului:

Nu se evidențiază semne de citoliză hepatică, absența bilirubinei urinare exclude hiperbilirubinemia conjugată plasmatică. Hemoglobina normală și numărul normal de reticulocite exclud procesul de hemoliză. Astfel prin excludere, se stabilește diagnosticul de sindrom Gilbert.

21.4.3 Carcinom de cap de pancreas

Un pensionar se prezintă la medicul de familie cu dureri epigastrice care iradiază în spate, fără asociere evidentă cu mesele. Tratamentul cu antiacide nu contribuit la scăderea durerilor, după câteva săptămâni bolnavul se prezintă din nou la consultație cu dureri mai intense. Bolnavul a scăzut în greutate, în ultimele săptămâni urina s a închis la culoare și scaunul a devenit acolic. La examenul clinic s-a constatat pe lângă scăderea în greutate și prezența unui icter.

- Examinări de laborator în ser:
  - Proteine totale 70 g/L
  - Albumină 38 g/L

- Bilirubină 20 mg/dL
- Fosfatază alcalină 530 U/L
- AST 87 U/L
- GGT 200 U/L

• Urină: Bilirubină: +++, UBG - absentă

• Examenul echografic a evidenţiat canale biliare lărgite.

• Examenul baritat demonstrează existenţa unei umbre extinse la nivelul porţiunii distale a duodenului, care a fost interpretat ca tumoare de cap de pancreas.

• Examenul CT abdominal, iar ulterior laparotomia confirmă diagnosticul de carcinom de cap de pancreas.

Interpretarea cazului:

Semnele clinice sugerează carcinom de cap de pancreas care obstruează ductul biliar. Rezultatele examinărilor de laborator pledează pentru un icter obstructiv. Pe baza acestor rezultate hepatopatia nu poate fi confirmată dar nici nu se exclude. Diagnosticul de carcinom de cap de pancreas este susţinut de rezultatele examinărilor imagistice şi paraclinice, dar obstrucţia poate fi produsă în aceeaşi măsură de calculi care obstruează papila Vater, de tumoare care mestastazează în nodulii limfatici din hilul hepatic sau de colestază intrahepatică.

21.4.4 Ciroză hepatică alcoolică

O femeie de vârstă medie se internează în spital cu hematemeză. Endoscopia evidenţiază varice esofagiene, care au fost tratate prin sclero-terapie. I se recomandă bolnavei să evite consumul de alcool. Peste doi ani pacienta se prezintă din nou cu icter, somnolenţă şi semnele clinice ale unei hepatopatii.

Examinări de laborator în ser:

- Albumină 30 g/L
- Bilirubină 15 mg/dL
- Fosfatază alcalină 400 U/L
- AST 200 U/L
- GGT 320 U/L

La electroforeza proteinelor plasmatice se evidenţiază punte beta2-gama.

Interpretarea cazului:

Albumina scăzută, bilirubina crescută şi modificările enzimatice susţin diagnosticul de ciroză hepatică şi citoliză hepatică consecutivă consumului de alcool.

21.4.5 Colestaza postoperatorie

Un bărbat în vârstă se internează în spital cu icter şi simptomatologie de abdomen acut. Clinic s-a constatat peritonită generalizată, examenul radiologic a pledat pentru perforţie de organ intern. Laparotomia a evidenţiat un diverticul fisurat pe colonul sigmoid. S-a efectuat lavaj peritoneal şi s-a practicat o colostomie. După 72 de ore bolnavul prezintă în continuare stare alterată, cu hipotensiune refractară la aministrare de lichide prin perfuzie şi substanţe inotrope.

Examinări de laborator:

- Leu: 12.000 x 10^6/L
- Bilirubină 5 mg/dL
- AST 130 U/L
- Fosfatază alcalină 200 U/L

Interpretarea cazului:

Fosfataza alcalină crescută sugerează existenţa unei colestaze, AST-ul crescut poate fi cauzat de citoliză hepatică sau de existenţa unui proces de citoliză la nivelul altor ţesuturi. Bolnavul este hipotensiv şi se găseşte în stare septică. Colestaza postoperatorie în cazul acesta este multifactorială, poate fi cauzată de capacitatea excretorie scăzută a ficatului, obstrucţia intrahepatică sau modificările survenite în compoziţia bilei.

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Cucuianu M. Fiziopatologia biochimică a secreţiei biliare In Crîsnic I., Cucuianu M., Pleşca-Manea L. eds.: Biochimie clinică. Fundamentare fiziopatologică. University Press, Arad, 2001: 217-258.
4. Fischbach F. – *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
5. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991.
6. Kaplan A.L., Pesce J.A. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984.
7. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996.
8. Marshall WJ. A máj. In Marshall WJ,ed. Klinikai kémia, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2003:99-118.

9. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine,* Williams & Wilkins, 1994.
10. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu-Gheorghiu M. – *Biochimie medicală,* Ed. Medicală, 1998, 2000.
11. Zakim D., Boyer T.D. – *Hepatology. A Textbook of Liver Disease*, Ed.4, Philadelphia: WB Saunders Company, 2002.
12. Zamfirescu-Gheorghiu M., Popescu A. - *Tratat de Biochimie medicală,* vol I-II, Ed. Medicală, 1991.
13. www.informed.hu/&prk=30474474&larticle=78032&tPath=/szakmai_oldalak/fekete_msd/section04/ch048/, The Merck Manual, ed.aII-a, 2000.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 22. Patochimia tubului digestiv

Liviu Sorin Enache, Minodora Dobreanu

Funcţia de bază a tubului digestiv constă în degradarea şi absorbţia substanţelor nutritive şi eliminarea reziduului sub forma materiilor fecale.

Ingerate ca şi macromolecule, principiile nutritive trebuie fragmentate în componente simple, absorbabile; acest proces (*digestia)* este realizat de către enzimele secretate de tractul gastrointestinal, acţiunea cărora este susţinută şi de procesele mecanice implicate în digestie (masticaţia, deglutiţia, motilitatea gastrică şi intestinală care asigură tranzitul digestiv), precum şi de diferenţele de pH între anumite regiuni ale tubului digestiv şi de fluxul hidro-electrolitic prin mucoasele gastrointestinale.

Prin celulele lui speciale, cromafine, alcătuind sistemul producător, primitor şi degradator al aminelor (Amine Production, Uptake and Degradation, APUD), tubul digestiv are şi funcţii endocrine importante, iar prin structurile sale limfoide (plăcile Payer) - limfo-plasmocitare şi monocito-macrofagice - dispune de un sistem imun asociat intestinului, care pe plan umoral reacţionează prin anticorpi din clasa IgA.

22.1 Funcţiile digestive ale cavităţii bucale şi esofagului

Digestia bucală este prima fază a procesului de descompunere a componenţilor alimentari şi cuprinde două procese: prelucrarea mecanică (masticaţia) şi transformările chimice sub acţiunea salivei. Rezultatul digestiei bucale este bolul alimentar.

Saliva este secretată în proporţii diferite de către glandele salivare: 25% de glandele parotide, 70% de submandibulare şi 5% de glandele sublinguale. Se prezintă sub formă de lichid incolor sau uşor opalescent, cu densitatea 1003-1008 mg/cm^3, având un pH uşor acid (6,1-7,4). Saliva este compusă din 99,5% apă şi 0,5% substanţe organice şi anorganice. Substanţele organice din salivă sunt reprezentate de proteine – enzime (amilaza salivară sau ptialina, care descompune amidonul în dextrine şi care este inactivată în stomac de către pH-ul acid, lizozim şi kalikreina) –, glicoproteine (mucine) şi la 80% din indivizi (numiţi *secretori)*, antigene de grup sanguin. Substanţele anorganice sunt reprezentate de HCO_3^-, Ca^{2+}, Na^+, K^+, F^-, I^-. Secreţia salivară atinge 1200-2000 mL/zi şi se află sub influenţa reflexelor condiţionate declanşate de stimuli olfactivi, auditivi, vizuali şi necondiţionate, declanşate de stimularea receptorilor gustativi, chemoreceptorilor şi mecanoreceptorilor.

Funcţiile îndeplinite de către salivă sunt atât digestive (hidroliza amidonului, efect lubrifiant, formarea bolului alimentar, rol gustativ prin solubilizarea substanţelor sapide), cât şi nedigestive (efectul anticarie, prin lizozim, fluor şi prin tamponarea acizilor din alimentaţie, rol în echilibrul hidro-electrolitic şi în eliminarea unor substanţe exogene: Pb, Hg, antibiotice precum tetraciclina, virusuri).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

22.2 Patochimia şi explorarea de laborator a funcţiilor gastrice

Din punct de vedere funcţional, cavitatea stomacului se împarte în: zona fundică (cuprinzând cardia, fornixul), corpul gastric şi zona pilorică (cuprinzând antrul şi canalul piloric).

Mucoasa gastrică este formată din epiteliu mucos, cilindric şi glandular, cubic, precum şi din corion.

Glandele gastrice diferă pe plan structural şi funcţional în funcţie de localizarea lor în diferitele zone ale stomacului:

1. Glandele cardiale sunt glande tubuloase complexe, conţinând celule cubice. Ocupă o mică zonă a mucoasei gastrice în jurul cardiei şi secretă mucine neutre.

2. Glandele fundice sunt localizate în zona fundică şi în tot corpul gastric. Au structura glandelor tubuloase simple, conţinând mai multe feluri de celule. Celulele mucinoase se localizează spre gâtul glandelor, produc şi secretă mucina PAS pozitivă. Celulele parietale (oxintice) ocupă zona din mijloc a glandelor, au formă de pară şi comunică cu cavitatea glandulară printr-un canal foarte subţire. Aceste celule secretă apă, electroliţi, acid clorhidric, precum şi factorul intrinsec Castle, necesar pentru absorbţia vitaminei B_{12}. Celulele principale sunt abundente în porţiunea bazală a glandelor şi secretă proenzimele: pepsinogen şi gastrixina. Aceste glande cuprind şi o serie de celule cu funcţie endocrină, care secretă motilina, substanţa P, peptidul vasoactiv intestinal (VIP) şi amine biogene.

3. Glandele pilorice sunt glande tubuloase compuse. Ocupă regiunea antrală a stomacului. Sunt alcătuite din celule epiteliale prismatice, care secretă mucine şi pepsinogen.

Mucoasa gastrică conţine şi alte tipuri de celule secretoare, care fac parte din sistemul APUD al tubului digestiv. Celulele enterocromafine (EC) secretă serotonina; cele similare cu acestea (enterocromaphine-like, ECL) produc catecolamine; celulele G, localizate în regiunea antro-pilorică secretă gastrina; celulele A şi D sunt similare cu celulele A şi D ale pancreasului.

22.2.1 Funcţia secretorie gastrică

22.2.1.1 Sucul gastric

Este un lichid limpede, incolor, cu densitatea de 1002-1004 mg/cm^3, compus din apă, acid clorhidric (HCl), electroliţi (Na^+, K^+, H^+, Cl^-, HCO_3^-, $H_2PO_4^-$ şi HSO_4^-), mucus, proteine şi proenzime. Cantitatea de suc gastric secretat în 24 de ore variază între 1200 - 1600 mL, din care un sfert este prezentă ca secreţie spontană nocturnă.

Din punctul de vedere al explorării funcţiei gastrice, se deosebesc 2 feluri de secreţii: secreţia spontană sau bazală, şi secreţia stimulată. Secreţia spontană este în medie de 50 mL/oră, iar cea stimulată variază între 120 - 160 mL/oră. Ritmul circadian al secreţiei prezintă câte un maximum între orele 10 - 13 şi 23 - 02 şi câte un minimum între mesele zilnice, respectiv în restul orelor de noapte.

Secreţia sucului gastric este un proces complex, care cuprinde secreţia apei, a unor electroliţi, inclusiv acidului clorhidric, secreţia enzimelor proteolitice şi a mucinelor.

Formarea şi secreţia acidului gastric: cantitatea ionilor de H^+ în sucul gastric este de cca. 3 milioane de ori mai mare (170 mmol/L), decât în plasmă (0,00005 mmol/L), ceea ce pledează pentru un transport deosebit de activ al H^+, împotriva unui gradient de concentraţie extrem de mare. Celulele parietale, secretoare de acid clorhidric, pot fi excitate prin diferiţi mediatori fixaţi pe receptorii lor de membrană. Histamina stimulează receptorii H_2 ai celulelor şi provoacă prin intermediul cAMP, în mod selectiv creşterea secreţiei gastrice. Alţi receptori comuni, răspund printr-o secreţie sporită, atât la gastrină, cât şi la acetilcolină, prin intermediul inozitol-trifosfatului, diacilglicerolului şi ionilor de Ca^{2+}. Cimetidina inhibă secreţia acidului gastric prin blocarea receptorilor H_2. În interiorul celulelor parietale, sub acţiunea anhidrazei carbonice, din apă şi bioxid de carbon se formează acid carbonic: H_2CO_3. Prin disociere electrolitică, acidul carbonic pune în libertate ioni HCO_3^- şi H^+, cei din urmă reprezentând partenerii ionilor de Cl^- din acidul clorhidric. Ionii de Cl^- sunt transportaţi de către o ATP-ază Na^+/K^+-dependentă. Din fiecare 3 molecule de NaCl introduse în celule, câte 2 ioni de Na^+ se vor

forma bicarbonați, în schimbul rămânerii în celulă a unui număr egal de ioni de Cl, sub forma de KCl. Restul de Cl^- se excretă împotriva unui gradient de concentrație la polul apical al celulei parietale. Astfel, ionii de H^+ și Cl^- din acidul clorhidric se excretă separat și formează acidul gastric numai în lumenul canalelor glandulare. Debitul bazal al secreției HCl este de 2 - 4 mL/oră.

Secretina, somatostatina, VIP, GIP, glucagonul și prostaglandina PGE2 (protectoare) inhibă secreția gastrică prin intermediul cAMP.

22.2.1.2 Enzimele din sucul gastric

Pepsinogenul: este sintetizat în celulele principale (zimogene), care apoi îl depozitează sub formă de granule. Este eliberat la stimuli alimentari, colinergici, histaminici și hormonali: gastrina, insulina, glucagonul, secretina. Pepsinogenul poate fi separat în mai multe fracțiuni: primele 4 fracțiuni formează grupa I de pepsinogen, iar fracțiunile 5-7, grupa a II-a. Grupa I este prezentă în plasmă (140 - 160 μg/L) și excretată în urină sub formă de uropepsinogen. Cantitatea în urină a uropepsinogenului crește în mod caracteristic la bolnavii cu boală ulceroasă. În sucul gastric pepsinogenii se transformă în pepsine active (pepsina A, B și C sau gastrixina) prin autocataliză în mediu acid, având activitatea optimă la pH = 2,0, gastrixina la pH = 3,0. Pepsina este o endopeptidază, care scindează legăturile peptidice în care aminoacizii aromatici participă cu gruparea carboxil. Scindarea legăturilor peptidice este incompletă, acțiunea proteolitică a pepsinei nefiind esențială în digestia proteică, gastrectomia, chiar totală, fiind bine tolerată. Pepsina mai are rol în coagularea laptelui și în descompunerea componentelor proteice alimentare prin eliberarea Fe^{3+}.

Lipaza gastrică este o tributirază cu $pH_o = 4,5$. Este importantă la nou-născut și sugar, la care pH-ul sucului gastric este 4-4,5, acționând asupra grăsimilor emulsionate din lapte și ou.

Renina gastrică (labfermentul) determină coagularea laptelui în prezența Ca^{2+}.

22.2.1.3 Mucusul gastric

Secretat de celulele mucoase, este de o importanță fundamentală pentru protejarea mucoasei gastrice împotriva efectelor nocive ale acidului gastric. Se găsește atât sub formă dizolvată în sucul gastric, cât și depusă pe suprafața epiteliului, alcătuind un strat dens, vâscos, cu grosimea de 0,5-2,5 mm. Mucusul gastric are doi componenți principali: *sulfomucinele* (glucozaminoglicanii acizi sulfatați: condroitin-sulfații, factorul lipotrop, inhibitorul pepsinelor) și *glicoproteinele* neutre (fucomucinele) și acide (acidul sialic), la secretori conținând și determinanții de grup sanguin. Secreția mucusului gastric este crescută de către excitațiile locale mecanice și chimice, reprezentate de scăderea pH-ului și alcool, de nervul vag, prin acetilcolină și de prostaglandinele E_1 și E_2. Bariera mucoasei gastrice, descrisă de Davenport, este un mijloc de protejare a peretelui gastric, alcătuit din stratul de mucus de la suprafață și structurile lipoproteice din membrana celulelor mucoasei gastrice, având rolul de a împiedica retrodifuziunea H^+ în peretele gastric. Bariera poate fi perturbată de factori endogeni, precum refluxul biliar duodeno-gastric și de factori exogeni, de exemplu inhibitorii sintezei prostaglandinelor (derivații de acid salicilic, hormonii corticosteroizi). Acești factori perturbatori favorizează apariția ulcerului gastric.

22.2.1.4 Factorul intrinsec

Factorul intrinsec din sucul gastric este o glicoproteină cu masa moleculară de 115.000 D, sintetizată în celulele parietale, care asigură absorbția vitaminei B_{12} în porțiunea distală a ileonului. Gastrectomia totală reprezintă un pericol major de apariție a anemiei megaloblastice prin deficit de vitamină B_{12} (anemia pernicioasă). Dozarea factorului intrinsec este dificilă și se face prin testul Schilling, care constă în administrarea orală de vitamină B_{12} marcată cu ^{58}Co, urmată de determinarea concentrației sale sanguine și a eliminării urinare.

22.2.2 Reglarea secreției gastrice

Secreția bazală gastrică prezintă o ritmicitate circadiană, precum și diferențe individuale marcante din punct de vedere cantitativ. Stimularea parasimpatică prin intermediul vagului și gastrina constituie excitanții principali ai secreției ba-

Tabel 22.I. Gastrina – funcții și controlul secreției

Efecte	Controlul secreției
Stimulează: • Secreția acidă gastrică • Secreția de pepsinogen • Secreția de factor intrinsec • Motilitatea gastrică • Creșterea mucoasei gastrice • Eliberarea secretinei din intestinul subțire • Producerea de bicarbonat de către pancreas	Stimulată de: • Impulsuri vagale • Distensia gastrică • Prezența alimentelor în stomac (aminoacizii și peptidele) • Calciul plasmatic • Alcool Inhibată de: • Aciditatea gastrică • Hormoni gastrointestinali (ex. secretina)

zale. Creșterea secreției în urma stimulării gastrice se manifestă în 3 faze:

1. Faza cefalică, determinată de reflexe condiționate, mediate de nervul vag;

2. Faza gastrică, declanșată de prezența bolului alimentar în stomac și de stimularea chimică, ducând la eliberarea gastrinei. Mecanismele stimulatoare sunt reprezentate de reflexe locale gastrice și reflexe vago-vagale, cu eliberarea acetilcolinei. Între secreția zonei antrale și fundice a stomacului se manifestă în mod continuu o cuplare inversă, reglatoare. Mecanismele inhibitorii ale fazei gastrice sunt feed-back-ul negativ realizat de scăderea pH-ului, eliberarea de somatostatină din celulele D sub acțiunea vagului și prostaglandinele E_1 și E_2 care acționează prin intermediul AMPc.

3. Faza intestinală, inițiată de pătrunderea chimului gastric în duoden, respectiv prin impulsurile vagale colinergice și manifestată prin secreția mai multor mediatori reglatori de origine duodenojejunală, ca enterogastronul, secretina, colecistokinina-P etc. În mecanismele stimulatorii intervin gastrina intestinală (G_{34}), eliberată în prezența polipeptidelor ajunse în duoden și motilina, crescută de alimentele bogate în lipide. În mecanismele inhibitorii sunt implicate polipeptidele din grupa glucagon-secretină: enteroglucagonul, secretina, VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) și GIP (Gastric Inhibitor Peptide).

Reglarea secreției gastrice a acidului clorhidric se face prin intermediul acetilcolinei (neuromediator al nervului vag care acționează pe receptorii muscarinici și este antagonizată de atropină), histaminei produse de către celulele enterocromafine din mucoasa gastrică (care acționează prin efect paracrin asupra receptorilor H_2) și prin intermediul efectului endocrin al gastrinei produse de celulele G ale glandelor antro-pilorice. Factori stimulatori ai secreției de HCl sunt cofeina, alcoolul, insulina (care, prin hipoglicemie, acționează asupra centrilor bulbari și hipotalamici, declanșând un reflex vagal) și stările emoționale (de asemenea, prin mecanism hipotalamic). Secreția acidă gastrică nu este crescută de grăsimi și de glucoză. Somatostatina, secretina, glucagonul și GIP inhibă secreția gastrică de HCl. Secreția de pepsinogen este stimulată de histamină, gastrină, secretină și acetilcolină. Prostaglandinele A, E_1 și E_2, GIP, medicația anticolinergică, antihistaminică și vagotomia se opun secreției de pepsinogen.

Principala sursă de gastrină este reprezentată de celulele G antrale, deși sinteza sa mai are loc și în intestinul subțire și în pancreas. Gastrina este transportată pe cale sanguină la organele țintă: stomac, intestin subțire și pancreas, asupra cărora își exercită efectele (*Tabelul 22.I*). Există trei forme active de gastrină: cu 34 aminoacizi (G-34, gastrina mare), cu 17 aminoacizi (G-17, gastrina mică) și cu 14 aminoacizi (G-14, minigastrina). Toate variantele au aceeași secvență C-terminală de aminoacizi.

22.2.3 Tulburări ale funcției gastrice

Hipersecreție gastrică este întâlnită în ulcerul duodenal și în sindromul Zollinger-Ellison. Cel din urmă este datorat prezenței unei tumori secretante de gastrină (gastrinom), care duce la expan-

siunea masei celulare parietale, cu hiperproducție de acid clorhidric, având drept rezultat apariția unor ulcerații rezistente la tratamentul medicamentos. Majoritatea gastrinoamelor (85%) sunt pancreatice, restul apărând în duoden și, mai rar, la nivelul stomacului și splinei. Riscul de malignizare este 60-65%, fiind mai crescut la cele pancreatice și mai scăzut la cele duodenale.

Ulcerul gastric și carcinomul gastric sunt însoțite de un status hiposecretor gastric. Distrugerea autoimună a celulelor parietale gastrice cauzează aclorhidrie, dar și un deficit de secreție a factorului intrinsec. Aceasta are drept consecință afectarea absorbției vitaminei B_{12} și apariția anemiei pernicioase.

22.2.4 Explorarea de laborator a funcțiilor gastrice

Principalele modalități de explorare gastrică sunt considerate examenul radiologic, endoscopic și bioptic, examenul biochimic al secreției gastrice având o valoare limitată.

22.2.4.1 Evaluarea secreției acide gastrice

Este utilă în diagnosticul sindromului Zollinger-Ellison, anemiei pernicioase sau în vederea aprecierii eficienței sau necesității vagotomiei ca procedură chirurgicală.

Explorarea directă

Parametrii secretori studiați sunt:

- Debitul orar al secreției bazale (mL/h): DOB;
- Debitul acid orar al secreției bazale (mEq/h), în notare internațională (QH^+): DAB;
- Concentrația HCl în secreția bazală (mEq/L);
- Debitul orar al secreției stimulate (mL/h): DOS;
- Debitul acid orar maximal (mEq/h): DAS;
- Concentrația HCl în secreția stimulată.

Obținerea sucului gastric pentru analiza biochimică se face în urma unei pregătiri serioase a bolnavului. Cu 24 ore înaintea testului este suprimată administrarea medicamentelor care influențează secreția gastrică (anticolinergice, colinergice, antihistaminice - antagoniști H_2, inhibitori ai pompei de protoni, inhibitori ai anhidrazei carbonice, antiacide, sedative, antidepresive) și este interzis consumul de condimente, cafea și alcool. Testul se începe după 12 ore de post nocturn, prin introducerea unei sonde nasogastrice la nivelul antrului piloric, sub control radiologic. Primul volum extras reprezintă reziduul gastric și, în mod obișnuit, nu depășește 50 mL. În caz de stenoză pilorică, lichidul rezidual este abundent și conține resturi de alimente consumate cu 1 - 2 zile în urmă, chiar și sânge. În caz de anaciditate, în sucul gastric devenit alcalin cresc lactobacili (producători de acid lactic, identificabil cu reacția Uffelman). La un interval de 60 de minute se aspiră din nou toată cantitatea de suc gastric, reprezentând debitul orar bazal (DOB), având volumul fiziologic între 40 - 60 mL, conținând 2-10 mmol/L acid clorhidric, ca debit acid bazal (DAB). În urma determinării valorii DOB și DAB, se trece la stimularea secreției gastrice. Pentru acest scop, Lambling propune administrarea subcutanată a histaminei în cantitate de 0,01 mg/Kg corp. Efectele adverse neplăcute ale histaminei pot fi prevenite prin administrarea prealabilă a antihistaminicelor, care nu influențează efectele stimulatoare ale acestei substanțe asupra secreției gastrice. După 60 de minute de la administrarea histaminei se aspiră următoarea fracțiune de suc gastric, al cărei volum reprezintă debitul orar stimulat (DOS), având limitele normale între 140 - 160 mL/oră și conținutul în acid clorhidric (debitul acid stimulat, DAS), de 10-45 mmol/L. Valoarea raportului DAB /DAS în condiții fiziologice este între 0,2-0,4, crește în stări de hiperaciditate și scade în neoplazii.

Cel mai puternic stimulator al secreției acide gastrice este gastrina. Agentul standard de stimulare a secreției acide gastrice este actualmente pentagastrina - un compus sintetic, care are un efect mai puțin intens, dar apropiat de cel al gastrinei.

Testul de stimulare cu insulină este util în aprecierea indicației operației de vagotomie sau pentru verificarea rezultatului postoperator, bazându-se pe principiul că insulina determină hipoglicemie care stimulează nucleul dorsal al vagului, ceea ce duce la creșterea secreției gastrice. Se administrează intravenos insulină în doză de 0,2 U/Kg corp. Se recoltează complet secreția gastrică timp de 2 ore de la administrarea insulinei, fie la intervale de 15 minute (8 probe), fie la interval de 30 minute (4 probe). Se recoltează și

Tabelul 22.II. Rezultatele testului de stimulare cu insulină la individul sănătos

	Volumul secreției gastrice (mL/h)	Debitul acid (mEq/h)	[HCl] (mEq/L)
Bazal	30-70	2 - 10	30-70
Stimulat	140-160	10-45	100

Tabelul 22.III. Modificările acidității sucului gastric (mmol/L) în diferitele boli digestive

Parametrul	Ulcer gastric	Ulcer duodenal	Carcinom gastric	Sindromul Zollinger-Ellison
DAB (mEq/h)	< 2	> 15	< 1	> 20
DAS (mEq/h)	< 10	30 – 80	< 10	30 – 100
DAB/DAS	<0,2	> 0,4	0,1 - 0,2	> 0,5

probe de sânge pentru determinarea glicemiei, prima înainte de începerea testului și următoarele paralel cu recoltarea secreției gastrice. Se consideră valabile rezultatele examinării numai dacă glicemia scade sub 50 mg/dL. Valorile obținute la individul normal sunt cuprinse în *Tabelul 22.II.*

Prin determinarea cantitativă a acidității libere și totale se pot stabili următoarele stări: normaciditate, hiperaciditate, hipoaciditate și anaciditate histamino-reactivă sau histamino-refractară. Modificările acidității sucului gastric în diferite afecțiuni digestive sunt prezentate în *Tabelul 22.III.*

22.2.4.2 Determinarea nivelului gastrinei serice

Nivelul gastrinei serice poate fi util în diferențierea afecțiunilor gastrice. În timp ce nivelul gastrinei poate fi normal crescut ca urmare a răspunsului fiziologic la hipoaciditate (de exemplu, postgastrectomie), în cazul hiperplaziei sau neoplaziei celulelor secretante de gastrină, nivelul acestui hormon nu mai răspunde la controlul obișnuit prin feedback, hipergastrinemia care apare fiind considerată inadecvată.

Gastrina se determină din ser, după post nocturn și (întrucât gastrina este un compus labil) proba de sânge este păstrată congelată până la efectuarea determinării sau este amestecată cu aprotinină, un inhibitor de proteaze, imediat după recoltare.

Nivelul de referință este de 30-100 ng/L, la indivizii în vârstă putând fi observate concentrații serice mult mai crescute. Există variații ale gastrinemiei în cursul zilei, cu un minim în primele ore ale dimineții. În *Tabelul 22.IV* sunt enumerate câteva cauze de hipergastrinemie, care pot fi diferențiate între ele prin răspunsul la secretină (1-2 U/kg corp, administrată în bolus intravenos) și la un prânz bogat în proteine.

22.2.4.3 Măsurarea pepsinogenului urinar

Peste 99% din pepsinogenul secretat de către celulele principale gastrice ajunge în lumenul gastric și este transformat în pepsină. O mică fracțiune din pepsinogenul produs difuzează în circulație și este excretat în urină, unde poate fi dozat prin metode biochimice și radioimune. Niveluri crescute de pepsinogen sunt întâlnite la pacienții cu secreție gastrică crescută, gastrită acută, ulcer duodenal și gastrinoame, în timp ce niveluri sub cele de referință apar la pacienți cu gastrită, mixedem, boală Addison și rezecție gastrică.

22.3 Patochimia și explorarea de laborator a digestiei și absorbției intestinale

22.3.1 Funcția intestinală normală

Intestinul subțire joacă un rol fundamental în digestia și absorbția substanțelor nutritive. Alături de acestea, prin funcționarea sistemului imun asociat intestinului, are funcții importante în domeniul apărării imune specifice și nespecifice. Prin găzduirea celulelor sistemului APUD, produce și unii mediatori cu acțiune locală, unii existenți însă și în sistemul nervos central. Mediatorii, celulele lor producătoare, localizarea intestinală a acestora și acțiunea lor sunt prezentate în *Tabelul 22.V.*

Tabelul 22.IV. Cauze de hipergastrinemie

Afecțiunea	Secreția acidă gastrică	Răspunsul gastrinemiei la:	
		Secretină	Prânz proteic
Sindromul Zollinger-Ellison	Intens ↑	↑	Normal
Hipersecreție de gastrină de către celulele G antrale	Intens ↑	↓	Intens ↑
Post vagotomie	↓	↓	↑
Anemie pernicioasă	↓	↓	↑
Insuficiență renală cronică	Variabilă	↓	Normal

Având lungimea de 5-9 m și diametrul de 4-5 cm, intestinul subțire are o suprafață de absorbție deosebit de mare, amplificată, pe de o parte, prin plierea mucoasei și a vilozităților intestinale, iar pe de altă parte, prin existența marginii în perie a membranei celulelor epiteliale mucoase.

Mucoasa intestinală este acoperită spre lumen de un singur strat de celule epiteliale cilindrice cu marginea în perie spre lumen, înconjurată de un mediu bogat în glicozaminoglicani (glicocalix). Membrana celulară situată la baza opusă a enterocitelor prezintă plieri multiple, sub forma unui labirint bazal ce corespunde aparatului Golgi. La acest nivel are loc transmiterea în sânge și în limfă a substanțelor absorbite. La baza pliurilor mucoase se situează celule glandulare (Lieberkühn) care secretă sucul intestinal cu un conținut bogat în apă, săruri, enzime și mucus.

Celulele cromafine fac parte din sistemul APUD gastrointestinal. Elementele limfatice din plăcile lui Payer alcătuiesc sistemul imun asociat intestinului, care acționează prin producerea de anticorpi din clasa IgA.

Absorbția apei și a substanțelor hidrosolubile, inclusiv a electroliților, se face fie prin difuzie pasivă, fie prin transport activ. Substanțele liposolubile se absorb sub acțiunea tensioactivă a acizilor biliari, urmată de pinocitoză. Prin funcția excretorie a celulelor Lieberkühn, absorbția intestinală are loc într-un mediu izoosmotic.

Pentru explorarea de laborator a funcțiilor intestinale sunt folosite teste directe și indirecte. Testele directe au la bază urmărirea cantitativă a eliminării în fecale a unor substanțe cu molecularitate redusă, ca glucoza, xiloza, galactoza, trigliceridele, fierul, neabsorbite din intestinul subțire. Condiția aplicării acestor teste este ca substanța utilizată să nu fie degradată de către flora microbiană intestinală.

Prin utilizarea testelor indirecte se urmărește absorbția intestinală prin creșterea nivelului plasmatic și măsurarea excreției în urină a substanțelor alese pentru acest scop.

Intestinul gros, compus din cec, colon ascendent, transversal, descendent, sigmoid și rect, reprezintă ultimul segment al tubului digestiv. Are diametrul de 6-8 cm și lungimea de 130-180 cm, cu suprafața internă de 640-1.600 cm^2.

La adult, colonul primește zilnic din ileonul terminal 300 - 500 mL de chim, din care se reabsorb 200 - 350 mL, restul transformându-se în materii fecale. Cantitatea zilnică a acestora este de 150 - 180 g, formată din 90 % apă și restul de 10 % conținând săruri anorganice, resturi vegetale nedigerate (celuloză), grăsimi, mucus, bacterii, celule epiteliale descuamate etc.

Intestinul gros secretă un suc vâscos, alcalin (pH = 8,0 - 8,4), bogat în bicarbonați și K^+. Cu excepția lizozimului, secreția colonului nu conține enzime. Cele 500 de tulpini diferite ale florei microbiene din intestinul gros sunt nepatogene. În schimb au funcții digestive importante: degradează resturile vegetale, descompun aminoacizi cu formarea aminelor biogene. Marea lor majoritate sunt anaerobi, producând putrefacția proteinelor neabsorbite, cu formarea indolului, scatolului, fenolilor, crezolului, hidrogenului sulfurat. O cantitate mică din aceste substanțe este absorbită și neutralizată prin detoxifiere în hepatocite. Reab-

Tabelul 22.V. Mediatorii sistemului APUD – sursă, localizare şi acţiune

Nr. crt.	Mediator	Celula de origine	Localizare intestinală	Acţiune
1	Motilina	EC2	duoden, jejun	stimularea evacuării gastrice şi intestinale
2	Substanţa P	EC1	duoden, jejun	modulare gastrică, pancreatică
3	GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide)	K	duoden, jejun	stimularea secreţiei insulinei, inhibă secreţia acidă gastrică
4	Somatostatina	D	duoden, jejun	inhibarea secreţiei insulinei, glucagonului şi eliberarea gastrinei
5	Entero glucagon	L	duoden, jejun	stimularea activităţii motorii, gluconeogenezei
6	Secretina	S	duoden, jejun	stimularea secreţiei pancreatice (a apei şi HCO_3^-), secreţia gastrică a pepsinei, sfincterul piloric; înhibă secreţia gastrinei şi motilitatea gastrică
7	Colecistokinina	I	duoden, jejun	contracţia vezicii biliare, a stomacului şi pilorului, motilitatea intestinală, secreţia enzimatică a pancreasului
8	VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide)	D1,H	duoden, jejun	neurotransmiţător (efect vasodilatator / hipotensiv), inhibă secreţia pepsinei şi HCl, eliberarea gastrinei; relaxează musculatura gastrică
9	Bombesina	P	duoden	stimulează eliberarea gastrinei şi secreţia pancreatică

sorbţia din colon este minimă: se reabsorb numai apa (300 - 350 mL/zi) şi ionii de Na^+ şi Cl^-.

22.3.2 Malabsorbţia de cauză intestinală

Asimilarea improprie a nutrienţilor se poate datora fie imposibilităţii scindării macromoleculelor (maldigestie), fie imposibilităţii absorbţiei substanţelor nutritive după ce acestea au fost digerate (malabsorbţie). În practică, deoarece sindroamele clinice rezultante sunt aceleaşi, termenul „malabsorbţie" este utilizat pentru a denumi ambele situaţii. Procesul patologic poate influenţa o singură clasă de nutrienţi (ex.: proteine, carbohidraţi, lipide, vitamine, minerale), o substanţă anume dintr-o clasă (ex.: lactoza) sau poate împiedica absorbţia unei game largi de substanţe aparţinând mai multor clase sau tuturor claselor de nutrienţi.

Diverse mecanisme pot fi responsabile pentru malabsorbţia la nivelul intestinului subţire. Cele mai importante sunt deficienţele enzimelor pancreatice (în pancreatitele cronice şi fibroza chistică), ale sărurilor biliare (în afecţiuni hepatice sau obstrucţii ale tractului biliar), afecţiuni intestinale (boala celiacă, Crohn, rezecţia parţială) sau creşterea bacteriană exagerată (fistule interne, diverticuloză). Simptomatologia clinică derivă din retenţia şi transferul de-a lungul intestinului a nutrienţilor neabsorbiţi (diaree, steatoree, discomfort şi distensie abdominală, flatulenţă), precum şi din absorbţia deficitară a nutrienţilor: anemie (deficit de fier, vitamină B_{12}), osteomalacia şi rahitismul (deficit de vitamină D), edeme (hipoalbuminemie), hemoragii (deficit de vitamină K), scădere în greutate sau deficit staturo-ponderal la copil.

Dozarea concentraţiei circulante a albuminei, calciului, fierului, feritinei, vitaminei B_{12}, folaţilor, a indicilor eritrocitari, precum şi a timpului de protrombină, sunt indicatori utili.

22.3.2.1 Sindromul de intestin scurt

Rezecţia a până la 50% din lungimea intestinului subţire este bine tolerată, cu condiţia ca intestinul proximal şi ileonul terminal să fie intacte. În cazul rezecţiilor extensive sau dacă segmentele proximal sau distal sunt afectate, se in-

BAU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

stalează sindromul de malabsorbție. Popularea bacteriană exagerată a intestinului subțire este un alt factor care contribuie la apariția malabsorbției, în cazul îndepărtării chirurgicale a barierei fiziologice reprezentate de valva ileocecală.

Malabsorbția indusă chirurgical poate fi provocată și în scop terapeutic: în trecut, bypass-ul jejuno-ileal era o metodă de tratament a obezității, iar bypass-ul ileonului terminal poate fi folosit în tratamentul hipercolesterolemiei familiale.

22.3.2.2 Anomalii ale mucoasei

Enteropatia glutenică (EG) reprezintă o afecțiune enterală cronică produsă de intoleranța la gluten, caracterizată prin următoarele aspecte:

- leziuni reprezentate de atrofia mucoasei;
- simptome determinate de malabsorbția globală sau selectivă a principiilor alimentare;
- ameliorare promptă și spectaculoasă la regimul alimentar fără gluten.

Glutenul și gliadina (peptida toxică din grâu), secalina din secară, averina (din ovăz), produc boala la persoane cu predispoziție genetică, declanșând la nivelul mucoasei intestinale un efect toxic și imunologic care va determina atrofia vilozitară, scăderea suprafeței de absorbție intestinală și malabsorbție.

Mecanismul patogenic are la bază susceptibilitatea genetică de a exprima pe suprafața limfocitelor T și a celulelor prezentatoare de antigen, glicoproteine HLA clasa a II-a a complexului major de histocompatibilitate, capabile de a fixa peptide alimentare și de a declanșa liza enterocitelor. EG nu este o boală autoimună, deoarece îndepărtarea peptidelor alimentare duce la ameliorarea și controlul afecțiunii, ceea ce nu se întâmplă în patologia autoimună.

În patogenia EG intervin atât mecanisme imune umorale, cât și celulare. Anticorpii antigliadină de tip Ig A și Ig G se detectează în serul și conținutul luminal intestinal al pacienților cu EG activă, asimptomatică sau tratată. Aceste teste sunt utilizate pentru detectarea persoanelor susceptibile, în special în cadrul screening-ului familial pentru EG. Anticorpii antigliadină pot persista perioade lungi de timp (peste 20 de ani) în serul pacienților cu EG sub tratament (dietă fără gluten).

Studii imunohistochimice au evidențiat în *lamina propria* intestinală, la pacienții cu EG, creșterea numărului limfocitelor secretante de IgA, IgM și Ig G.

Mecanismele imune celulare au un rol important în patogeneza EG. Limfocitele intraepiteliale reprezintă markerul imunologic tisular, fiind implicate în alterarea permeabilității mucoasei, eveniment precoce în EG. În *lamina propria,* limfocitele reprezintă principala populație celulară activată în prezența gliadinei, contribuind la patogeneza EG prin eliberare de citokine care determină injurie epitelială.

Simptomatologia constă în diaree cu steatoree, astenie fizică, scădere în greutate hipovitaminoze, sindrom hemoragipar. Boala are o evoluție ondulantă, cu remisiuni și recăderi, întâlnindu-se la copii cu vârsta între 2 și 5 ani și la adulții tineri în decadele 3-4.

22.3.2.3 Afecțiunile inflamatorii

Ileita terminală (boala Crohn) este o boală cronică caracterizată prin prezența unui proces inflamator cronic granulomatos care interesează diverse segmente ale intestinului. Malabsorbția din boala Crohn apare prin mai multe mecanisme. Ileonul terminal este frecvent afectat, ceea ce duce la o absorbție scăzută a vitaminei B12 și întrerupe circuitul entero-hepatic al acizilor biliari, cu malabsorbția lipidelor și a vitaminelor liposolubile. În stadii avansate de boală, pot apare stenoze și fistule (apariția unor anse oarbe la nivelul cărora bacteriile se dezvoltă în mod exagerat, producând deconjugarea acizilor biliari). Inflamația extensivă cauzează adesea pierderi de proteine în interiorul intestinului.

22.3.2.4 Afecțiuni vasculare

Ischemia intestinală poate împiedica absorbția principiilor nutritive din intestin.

22.3.2.5 Afecțiuni metabolice și endocrine

La diabetici, malabsorbția poate apărea datorită insuficienței exocrine pancreatice care însoțește insuficiența endocrină sau datorită neuropatiei vegetative.

Abetalipoproteinemia este o boală metabolică moştenită, rară, în care enterocitele nu pot sintetiza apolipoproteina B48. Trigliceridele nu pot fi incluse în chilomicroni şi se acumulează în mucoasa intestinală, împiedicând absorbţia nutrienţilor din lumen.

22.3.3 Investigarea funcţiei intestinului subţire

22.3.3.1 Digestia şi absorbţia dizaharidelor

Carenţa dizaharidazică este o afecţiune intestinală caracterizată prin deficitul de dizaharidaze enterocitare, enzime care scindează dizaharidele în monozaharide, deficit care determină tulburarea de absorbţiei acestor compuşi şi instalarea fenomenului de intoleranţă alimentară. Mucoasa intestinală conţine următoarele dizaharidaze:

- Sucraza – isomaltaza (enzime care scindează sucroza şi maltoza)
- Maltaza - gluconidaza (scindează oligozaharidele)
- Lactoza - florizinhidrolaza
- Trehalaza (scindează trehaloza).

Nescindate, dizaharidele nu mai pot fi absorbite, se acumulează în lumen, atrag apa şi electroliţii şi creşte conţinutul intestinal. În colon, dizaharidele sunt supuse acţiunii de scindare de către lactaza microbiană. Hexozele rezultate vor fi fermentate de bacterii, rezultând acizi, gaze, apă în exces cu efect iritant asupra mucoasei colonice. Simptomatologia se manifestă prompt după ingestia alimentului respectiv.

Carenţa lactazică reprezintă carenţa dizaharidazică cea mai importantă. Carenţa lactazică poate fi:

- Congenitală (enzima lipseşte de la naştere)
- Primară (este o reducere programată de la nou născut spre copil şi apoi adult)
- Secundară- determinată de boli cu localizare intestinală (parazitoze, rezecţii intestinale)

Simptomatologia clinică apare de fiecare dată după consumul de lapte sau preparate de lapte. La sugari simptomele apar în primele zile de viaţă, manifestate prin diareee de tip fermentativ, alterarea stării generale şi scădere progresivă în greutate. La adulţi domină diareea, dureri abdominale, flatulenţă. Testul de încărcare cu lactoză este testul care redă cel mai fidel digestia şi absorbţia lactozei. Acest test este completat cu examen radiologic şi biopsie jejunală cu dozarea enzimei din mucoasă. Tratamentul constă în înlocuirea laptelui la sugar, iar la adult reducerea cantitativă a laptelui şi a preparatelor din lapte. Aceste alimente fiind înlocuite, simptomele clinice se ameliorează prompt.

Testul hidrogenului respirator în intoleranţa la carbohidraţi

Epiteliul mucoasei intestinale conţine dizaharidaze care scindează dizaharidele din conţinutul intestinal în monozaharide, care pot fi absorbite.

Deficitul sau lipsa totală a uneia sau mai multor dizaharidaze duce la reţinerea substratului corespunzător în lumenul intestinal. Glucidele acumulate în exces produc diaree osmotică şi când ajung în colon, servesc drept sursă nutritivă pentru flora intestinală. În cursul metabolismului glucidic bacterian se formează hidrogen gazos (H_2), care este absorbit în circulaţia sistemică şi eliminat prin respiraţie. Întrucât celulele mamiferelor, nu produc H_2 în cursul metabolismului, cantitatea de H_2 care apare în aerul expirat este proporţională cu acţiunea fermentativă bacteriană asupra glucidelor neabsorbite.

În acest test se administrează oral un dizaharid corespunzător dizaharidazei al cărei deficit este suspectat. Dacă enzima respectivă are activitate scăzută, la 30-90 minute după ingestia glucidului creşte concentraţia H_2 în aerul expirat. Rare rezultate fals negative pot apare în caz de sterilitate a tractului gastrointestinal, de exemplu consecutiv administrării de antibiotice cu spectru larg.

O creştere prematură a H_2 poate apare şi în cazul unei colonizări bacteriene intense a intestinului subţire. Diagnosticul diferenţial între această situaţie şi deficitul unei dizaharidaze se poate face prin completarea investigării cu un alt test: se administrează oral câte 25 g din monozaharidele constituente ale dizaharidului administrat prima dată. Monozaharidele sunt în mod normal absorbite în intestinul subţire şi nu ajung în colon. Creşterea H_2 expirat consecutiv ingestiei celor două monozaharide sugerează colonizarea intensă a intestinului subţire.

Testarea deficitului de dizaharidaze prin dozarea glucozei serice

Digestia dizaharidelor este urmată, în mod normal, de o creştere a nivelului seric al glucozei, prin urmare, determinarea glicemiei poate fi utilă în evaluarea deficitului de dizaharidaze.

Pacientului i se administrează, după post nocturn, 50 g din dizaharidul a cărui enzimă digestivă corespunzătoare se presupune a fi deficitară. Se măsoară glicemia la fiecare 30 minute, timp de 2 ore.

La subiecţii sănătoşi, glicemia creşte cu cel puţin 20-30 mg/dL (>1,1-1,7 mmol/L) peste nivelul bazal. O creştere cu mai puţin de 20 mg/dL (<1,1 mmol/L) sugerează deficit de dizaharidază. Un rezultat pozitiv (creşterea glucozei serice cu mai puţin de 20mg/L) trebuie confirmat printr-un test de toleranţă la glucoza orală. Un răspuns anormal la administrarea dizaharidului şi o creştere normală a glicemiei după ingestia glucozei indică scăderea activităţii dizaharidazei intestinale.

22.3.3.2 Absorbţia carbohidraţilor

Teoretic, capacitatea de absorbţie a intestinului subţire ar putea fi determinată estimând asimilarea nutrienţilor, de exemplu, în cazul carbohidraţilor - absorbţia glucozei. Totuşi, glucoza este absorbită printr-un mecanism cu mare afinitate pentru substrat şi cu o rezervă funcţională considerabilă, o absorbţie alterată a glucozei apărând numai în cazuri de malabsorbţie severă. În plus, după ce a fost preluată din intestin, glucoza este supusă metabolizării, fapt ce nu permite folosirea nivelului seric al glucozei pentru estimarea absorbţiei intestinale.

Testul de absorbţie a D-Xilozei

Este testul cel mai frecvent utilizat pentru determinarea capacităţii de absorbţie a carbohidraţilor. Xiloza - un glucid vegetal - este absorbită la nivelul jejunului în proporţie de 60%, fără o digestie prealabilă. Nu este metabolizată în organismul uman şi este excretată nemodificată în urină, unde poate fi dozată, rezultatul variind în funcţie de cantitatea absorbită.

În cadrul unor teste mai vechi de absorbţie a xilozei se administrau oral 25 g D-xiloză, dar numărul rezultatelor fals pozitive era crescut la subiecţii sănătoşi, datorită xilozei neabsorbite care producea o intensificare a tranzitului intestinal (reducându-se absorbţia). Rezultate superioare pot fi obţinute prin administrarea unei doze de 5 g de D-xiloză, aceasta fiind mai apropiată de capacitatea de absorbţie a unui adult sănătos.

Testul este efectuat după post nocturn; pacientul trebuie să aibă vezica urinară goală la începutul testului. Se administrează oral 5g D-xiloză în apă. În următoarele 2 ore, pacientul trebuie să bea cel puţin 500 mL apă. Se colectează toată urina până la sfârşitul testului, care durează 5 ore. La 2 ore de la începerea testului se recoltează sânge pentru dozarea xilozei serice.

Apariţia D-xilozei în sânge sugerează faptul că absorbţia s-a produs. Unii autori afirmă că determinarea nivelului seric este mai sensibilă decât aprecierea excreţiei urinare, deoarece este mai puţin influenţat de variaţiile clearance-ului renal. După doza de 5 g, nivelul seric la 2 ore trebuie să fie mai mare de 20 mg/dL, iar cantitatea excretată în urină pe parcursul a 5 ore să fie peste 1,25 g (25% din cantitatea administrată).

Intervalul de referinţă pentru xiloza urinară la pacienţii vârstnici este mai scăzut decât la pacienţii tineri, datorită scăderii clearance-ului renal cu vârsta.

Limitările testului provin din faptul că necesită o funcţie renală adecvată pentru ca glucidul să fie eliminat pe parcursul celor 5 ore. Staza gastrică, vărsăturile, deshidratarea, ascita, edemele, mixedemul şi creşterea colonizării bacteriene intestinale pot duce la rezultate fals pozitive. Rezultate fals negative pot apărea în cazul tratamentului cu diuretice, antiinflamatoare şi antibiotice.

22.3.3.3 Investigarea absorbţiei lipidelor

În vederea investigării absorbţiei lipidelor au fost descrise numeroase metode, inclusiv colorarea materiilor fecale cu coloranţi cu afinitate pentru lipide şi măsurarea absorbţiei unei substanţe liposolubile, cum este vitamina A. Metodele cel mai frecvent utilizate sunt determinarea directă a lipidelor în scaun şi un test respirator pentru absorbţia lipidelor.

Determinarea lipidelor în scaun

Conţinutul în lipide al fecalelor este determinat după colectarea scaunelor timp de 3-5 zile la

pacienți care au avut o dietă normolipidică (70-100 g/zi) cu cel puțin 48 ore înainte de începerea recoltării. Subiecții normali excretă zilnic cel mult 5g lipide, acestea provenind în principal din turn-over-ul celulelor intestinale.

Deşi unii autori recomandă colectarea pe durată de o zi ca test de screening, testul standard este reprezentat de colectarea timp de 3 zile şi acesta ar trebui efectuat atunci când este suspectată prezența steatoreei.

Testul este neplăcut pentru toți cei implicați şi are valoare numai dacă este efectuat corect.

Este important să se aprecieze corect în cât timp au fost ingerate lipidele eliminate în scaun, ştiut fiind faptul că există o variație importantă a tranzitului intestinal de la o persoană la alta. Pentru aceasta poate fi utilizat drept marker un colorant neabsorbabil, cum ar fi carminul. Acesta este administrat oral şi colectarea scaunelor se începe atunci când marker-ul apare în scaun. O a doua priză de marker este administrată la 72 (sau 120) ore după prima, iar colectarea este oprită când acesta apare din nou în scaun.

Probabil cel mai dificil aspect legat de determinarea lipidelor fecale este problema estetică a colectării scaunelor, ducând la scăderea complianței pacienților şi la subestimarea pierderilor lipidice.

Pacienții cu malasimilare pierd o cantitate de lipide de peste 7 g/zi, concentrația în scaun fiind de peste 5g/100g fecale. Cei care suferă de maldigestie au aceste valori mai crescute decât cei cu malabsorbție. Valorile concentrației medii a lipidelor cuprinse între 5 şi 10 g% sunt asociate cu malabsorbție, iar valori peste 10 g% sugerează maldigestie.

Testul respirator cu ^{14}C-trioleină

Deşi determinarea lipidelor în scaun rămâne „standardul de aur" în diagnosticul steatoreei, această metodă, după cum am mai menționat, este puțin tolerată de către pacienți. De aceea, au fost căutate metode alternative, dintre care cea mai de încredere pare a fi testul respirator cu trioleină ^{14}C. Testul necesită aparatură pentru cuantificarea radiațiilor β, dar durează doar câteva ore.

Testul constă în administrarea unui triglicerid marcat cu ^{14}C, care este hidrolizat în intestin în monoacilglicerol şi acizi graşi liberi, compuşi care sunt absorbiți şi metabolizați în organism până la H_2O şi $^{14}CO_2$. Acesta din urmă este eliminat pe cale respiratorie, unde poate fi dozat. Dintre toate trigliceridele folosite, s-a observat că trioleina oferă testului sensibilitatea şi specificitatea cele mai apropiate de cele ale determinării lipidelor fecale. După post nocturn, pacientul ingeră o masă test conținând 20 g lipide conținând trioleina marcată cu ^{14}C. Aerul expirat în timpul testului este colectat într-o soluție de captare şi cantitatea de $^{14}CO_2$ este măsurată din oră în oră timp de 6 ore. Din moment ce, în aerul expirat, este determinat CO_2, activitatea fizică şi alimentația trebuie suspendate pe durata testului. $^{14}CO_2$ este exprimat ca procent din doza totală administrată, pe oră. Valoarea folosită în diagnostic este valoarea maximă obținută în timpul testului. În majoritatea cazurilor, valoarea maximă a $^{14}CO_2$ expirat pe oră apare la 4-6 ore de la ingestie. Se consideră că o valoare de 3,4% din doza totală diferențiază subiecții sănătoşi de cei cu steatoree.

Diverse afecțiuni pot influența rezultatul: pacienții obezi au o eliminare întârziată a $^{14}CO_2$, deoarece depozitează rapid lipidele în țesutul adipos. Rezultatele mai sunt influențate şi în caz de evacuare gastrică întârziată, insuficiență respiratorie, hiperlipidemie, diabet zaharat, insuficiență hepatică, afecțiuni tiroidiene etc.

Scăderea $^{14}CO_2$ expirat apare atât în malabsorbție, cât şi în maldigestie. Astfel, au fost descrise diverse modificări ale testului pentru a diferența steatoreea de cauză pancreatică de cea de alte cauze.

O variantă ar fi ca, la pacienții la care, în timpul testului descris mai sus, a fost observată o eliminare scăzută de $^{14}CO_2$, să se repete testul, de data aceasta administrându-se aceeaşi doză de trioleină însoțită de enzime pancreatice. Cei cu funcție pancreatică exocrină afectată ar trebui să răspundă de această dată printr-o eliminare normală a $^{14}CO_2$, în timp ce pacienții cu malabsorbție de alte cauze vor continua să elimine o cantitate scăzută de $^{14}CO_2$.

O altă variantă descrisă a fost administrarea concomitentă de trioleină şi acizi graşi neesterificați marcați în mod diferit – de obicei trioleina

cu ^{14}C şi acizii graşi cu tritiu (^{3}H). În cazul unei afecţiuni pancreatice, acizii graşi vor fi absorbiţi în intestin, deoarece nu necesită digestie de către lipază, în timp ce, în cazul unei afecţiuni intestinale, nici acizii graşi, nici trioleina nu vor fi asimilate de către organism, iar trasorii vor fi eliminaţi în cantitate redusă.

Deşi testul respirator cu trioleină marcată cu ^{14}C are sensibilitate şi specificitate bune în diagnosticul steatoreei, variantele sale folosite pentru diferenţierea între cauzele steatoreei nu s-au dovedit a fi de încredere.

Deoarece marcajul cu ^{14}C este radioactiv, acest test este contraindicat la copii şi la gravide. În aceste cazuri, se poate folosi trioleină marcată cu un izotop stabil, ^{13}C. Această variantă a testului necesitând însă echipamente sofisticate şi costisitoare – spectrometru de masă – este rezervată centrelor ultraspecializate.

Prânzul gras

Acest test constă în ingestia de către pacient dimineaţa, după post nocturn, a unei cantităţi de 50 g lipide (50% unt şi 50% margarină) urmate de determinarea, din oră în oră, timp de 5 ore, a trigliceridelor serice şi a chilomicronilor.

La populaţia de referinţă se observă o creştere de cel puţin 100 mg/dL sau de 100% a trigliceridelor peste nivelul bazal, iar chilomicronii depăşesc 7% din lipoproteinele serice, absorbţia maximă având loc la 3 ore de la ingestie. În cazul malasimilării lipidelor, creşterea trigliceridelor şi a chilomicronilor va fi mai modestă.

Testul are o sensibilitate şi o specificitate bune, fiind apropiate de cele ale determinării lipidelor fecale.

Examenul materiilor fecale

Testul calitativ pentru detreminarea grăsimilor fecale (colorația Sudan) este util în diagnosticul steatoreei moderate şi severe (excreţia a peste 10 % din aportul zilnic de aproximativ 60 g lipide). La examenul microscopic, picăturile de acizi graşi liberi rezultate din hidroliza la cald cu acid acetic glacial a grăsimilor fecale, apar colorate în roşu cu Sudan. Steatoreea moderată şi severă se recunoaşte prin prezenţa picăturilor lipidice în număr şi cu talie mai mare decât eritrocitele prezente în frotiul fecal.

22.3.3.4 Testarea absorbţiei aminoacizilor

Testarea absorbţiei aminoacizilor din intestin se face în cadrul procedurilor din cercetare. Malabsorbţia generalizată a aminoacizilor apare în afectarea extensivă a intestinului subţire. Malabsorbţia specifică a unor aminoacizi apare în boli metabolice congenitale: de exemplu, malabsorbţia triptofanului apare în boala Hartnup, în care este afectat transportul aminoacizilor neutri.

22.3.3.5 Malabsorbţia vitaminei B_{12} – testul Schilling

Vitamina B_{12} este un cofactor esenţial pentru sinteza ADN. Deficitul său se manifestă prin anemie megaloblastică şi afectare neurologică. Deşi flora intestinală sintetizează vitamina B_{12}, cantitatea respectivă este insuficientă pentru a preveni apariţia manifestărilor carenţei acestei vitamine. Principalele surse alimentare includ carnea şi produsele lactate.

Pentru a putea fi absorbită prin mucoasa ileală, vitamina B_{12} necesită prezenţa factorului intrinsec produs de celulele parietale gastrice. Cauzele deficitului de vitamină B_{12} includ scăderea producerii factorului intrinsec, pancreatită cronică, colonizarea bacteriană intensă a intestinului, afecţiuni ileale. Cantitatea scăzută de factor intrinsec este principala cauză a deficitului de vitamină B_{12}, dar până la 40% din pacienţii cu pancreatită cronică şi aproape toţi cei cu fibroză chistică prezintă acest deficit. Pentru a diferenţia carenţa de vitamină B_{12} prin deficit de factor intrinsec de cea de alte cauze, Schilling a propus în 1953 testul care îi poartă numele.

După post nocturn, pacientului i se administrează intramuscular 1000 μg vitamină B_{12}. Oral se administrează o doză de 0,5 μg vitamină B_{12} marcată radioactiv. Absorbţia vitaminei B_{12} marcate este evaluată prin măsurarea nivelului său în ser şi în urină. Eliminarea în urină este favorizată prin saturarea situsurilor de legare de către doza mare administrată parenteral.

Un subiect normal excretă în urină în primele 24 ore peste 8% din doza ingerată, în timp ce un pacient cu anemie pernicioasă excretă sub 7%.

Pacienţii cu deficit de factor intrinsec îşi corectează răspunsul în cazul administrării orale a

vitaminei B_{12} concomitent cu factorul intrinsec, în timp ce, în malabsorbția de altă etiologie, nu se observă nici o modificare.

22.3.3.6 Teste pentru colonizarea bacteriană exagerată

Colonizarea bacteriană intensă a intestinului subțire poate apărea în diverse situații, mai ales în caz de stază intestinală, datorată, spre exemplu, unei stricturi sau diverticulozei jejunale. Deconjugarea bacteriană a sărurilor biliare duce la perturbarea formării miceliilor și la malabsorbția lipidelor.

Un test indirect pentru prezența bacteriilor în număr mare în intestinul subțire este testul respirator care utilizează acid glicocolic (conjugatul cu glicină al acidului colic) marcat cu ^{14}C. Procedeul este similar cu testul respirator cu trioleină -^{14}C. Normal, acizii biliari sunt reabsorbiți în ileonul terminal și o cantitate mică este descompusă în intestin. În cazul dezvoltării bacteriene exagerate, în intestin se produce deconjugarea masivă a acidului glicocolic, ceea ce are drept rezultat eliberarea glicinei-^{14}C, absorbția și metabolizarea ei până la $^{14}CO_2$.

În cazul în care nu există creștere bacteriană exagerată intestinală, dar ileonul este afectat și este prezentă malabsorbția, acizii biliari ajung în colon, unde sunt metabolizați de către bacteriile care se găsesc normal la acest nivel, iar radioactivitatea scaunului crește.

Deși specificitatea testului cu acizi biliari marcați cu ^{14}C este relativ bună, sensibilitatea sa este slabă. Mai sensibil este testul cu xiloză marcată.

Cel mai de încredere test diagnostic pentru suprapopularea bacteriană a intestinului subțire este aspirarea și cultura din conținutul intestinal.

22.3.3.7 Depistarea hemoragiilor oculte

Hemoragiile oculte pot fi explorate cu ajutorul probei Gregersen, sau a unor teste rapide. Înaintea recoltării probei, pacientul consumă timp de trei zile un regim alimentar lipsit de hemine și de clorofilă (carne, frunze verzi). Din proba recoltată din materiile fecale eliminate în cursul zilei a 4-a, se întinde un frotiu pe o lamă de microscop. Hemul eliberat din hematiile lizate și prezent în probă, acționează ca o pseudo-peroxidază și descompune apa oxigenată adăugată ca atare sau eliberată în mediu acid din peroxidul de bariu. Oxigenul nativ eliberat transformă prin oxidare un indicator incolor (benzidina, guaiacolul), într-un derivat puternic colorat în albastru. Intensitatea culorii este direct proporțională cu intensitatea hemoragiei oculte.

22.4 Explorarea de laborator a funcțiilor pancreatice exocrine

Pancreasul este o glandă acino-tubulară mare, situată retroperitoneal în partea superioară a cavității abdominale. Ductul său principal (Wirsung) se deschide în duoden, împreună cu coledocul, la papila lui Vater.

22.4.1 Sucul pancreatic

Este un lichid incolor, transparent, cu reacție alcalină (pH = 8,0 - 8,7); se secretă într-un volum de 800-1.200 mL/zi. Privind compoziția, sucul pancreatic conține cantități de Na^+ și K^+ egale cu plasma. Anionii principali sunt bicarbonații și Cl^-. Prin excreția bicarbonaților se manifestă funcția hidrocinetică a pancreasului, prin care se facilitează excreția enzimelor, neutralizarea rapidă a chimusului gastric ajuns în duoden și asigurarea reacției alcaline optime pentru digestia intestinală. În celulele secretoare ale pancreasului bicarbonații se formează din apă și bioxid de carbon sub acțiunea carboanhidrazei. Ca urmare, inhibarea medicamentoasă a secreției acidului gastric prin administrarea inhibitorilor carboanhidrazei, reduce substanțial și funcția exocrină a pancreasului.

Funcția digestivă a pancreasului se manifestă prin formarea și secreția enzimelor digestive. Amilaza și lipaza pancreatică se excretă sub forma activă, în schimb, enzimele proteolitice și fosfolipazele se eliberează sub formă de proenzime (tripsinogen, chimotripsinogen, proelastază, prefosfolipază-A și B), care se activează de către o altă serinprotează (enterokinaza) din sucul intestinal. Sucul pancreatic mai conține în cantități reduse și alte enzime, ca hidrolaza esterilor steroidici, colagenaza, kalicreina, carboxipeptidaza A și B, ribonucleaze A - D, dezoxiribonucleaze A - D.

22.4.2 Reglarea funcției pancreatice exocrine

Funcțiile pancreatice exocrine stau sub un control nervos, umoral, chimic şi mecanic local.

a) Reglarea nervoasă se manifestă prin nervul vag şi splahnic, care trimit fibre secretorii (colinergice) la celulele musculare netede ale conductelor glandulare şi ale arteriolelor pancreasului. Fibrele simpatice postganglionare (adrenergice) inervează stratul muscular al vaselor pancreasului. Influxurile nervoase colinergice stimulează secreția exocrină a pancreasului, cele adrenergice o inhibă.

b) Reglarea umorală este realizată prin formarea şi eliberarea unor serii de mediatori de către celulele mucoasei intestinale. Dintre aceştia secretina (polipeptid cu 27 de aminoacizi), alături de stimularea colerezei şi a contracției vezicii biliare, stimulează secreția de bicarbonați şi de apă; pancreozimina (identificată cu colecistokinina - declanşatoarea contracției vezicii biliare) creşte secreția enzimelor pancreatice. S-a constatat şi faptul că pancreozimina are o secvență aminoacidică terminală (8 aminoacizi) similară gastrinei, astfel acest mediator stimulează şi secreția acidului gastric, dar a fost identificată şi în sistemul nervos central, având şi proprietăți de neurotransmițător. Atât secretina, cât şi CCK sunt secretate ca răspuns la prezența în duoden a acizilor, aminoacizilor şi proteinelor parțial digerate.

c) Reglarea locală se manifestă prin acțiunile locale stimulatoare asupra mucoasei duodenale ale acidului clorhidric şi diferiților produşi de digestie din chimusul gastric, provocând formarea şi eliberarea mediatorilor de origine intestinală. Ajunsă în duoden, bila exercită şi ea un efect stimulator indirect asupra funcțiilor exocrine ale pancreasului.

22.4.3 Parapedeza în sânge a enzimelor pancreatice

Aproximativ 1% din cantitatea enzimelor produse de celulele exocrine pancreatice se eliberează prin parapedeză (la polul vascular) în sângele circulant. Enzimele proteolitice pancreatice sunt inactivate de către antiproteazele plasmatice (α1-antitripsina, α1-antichimotripsina, α2-macroglobulina) din plasmă. În schimb, activitatea amilazei şi lipazei pancreatice poate fi determinată în plasmă. Amilaza serică există sub forma a 3 izoenzime: amilaza P (pancreatică), amilaza S (salivară) şi M (macroamilaza legată de imunoglobuline). Primele două forme, din cauza masei lor moleculare mai reduse (45.000 Da), se elimină şi prin urină. În pancreatita acută creşte considerabil activitatea serică a lipazei şi a amilazei, cu creşterea marcată şi a amilazuriei.

22.4.4 Afectarea funcției pancreatice exocrine

Cadrul nosologic în care apare o disfuncție pancreatică exocrină include diverse entități, printre care pancreatita acută, pancreatita cronică, carcinomul pancreatic şi fibroza chistică.

Scăderea funcției secretorii exocrine pancreatice devine manifestă clinic numai în stadii avansate de boală. Funcția pancreatică endocrină este în general bine conservată în aceste condiții, dar poate apărea intoleranța la glucoză în afectarea severă pancreatică.

Alte boli gastrointestinale pot mima efectele afectării pancreatice, fiind candidate la diagnosticul diferențial. De exemplu, enzimele pancreatice pot fi inactivate în sindromul Zollinger-Ellison sau activitatea lor poate fi împiedicată în cazul scăderii concentrației sărurilor biliare. Controlul secreției pancreatice exocrine este afectat în urma intervențiilor chirurgicale la nivelul stomacului.

22.4.4.1 Pancreatita acută

Pancreatita acută este o urgență medicală. Pacientul se prezintă cu durere abdominală severă (abdomen acut) şi grade variate de şoc, afecțiunea fiind descrisă clasic drept „marea dramă abdominală".

Cele mai frecvente cauze incriminate în etiologia pancreatitei acute sunt alcoolismul şi afecțiunile tractului biliar. Hipertrigliceridemia depăşind 750 mg/dL este asociată cu o probabilitate mare de a dezvolta pancreatită. Orice factor (exemplu: alcool, medicamente) care determină o creştere bruscă a trigliceridelor serice peste 1000 mg/dL poate precipita un puseu de pancreatită acută.

Spectrul patologic al pancreatitei acute variază de la pancreatita edematoasă, care este de

obicei autolimitată, la pancreatita necrozantă, cu evoluție gravă. Teoria patogenă modernă explică apariția pancreatitei acute prin activarea enzimelor proteolitice pancreatice în interiorul glandei şi nu în lumenul intestinal, de către diverşi factori, precum endotoxine şi exotoxine bacteriene, infecții virale, traumatismul direct, staza. Actual se consideră că ischemia şi hipoperfuzia pot singure să determine activarea tripsinogenului. S-a observat că, *in vitro*, enzimele lizozomale pot activa tripsinogenul. Enzimele proteolitice activate, în special tripsina, pot activa şi alte enzime, precum elastaza şi fosfolipaza. Enzimele active digeră membranele celulare, determină proteoliză, necroza celulelor parenchimatoase, necroză grasă, necroză de coagulare, edem, leziuni vasculare şi hemoragie interstițială. Prin leziunile celulare şi moartea celulară se eliberează enzime proteolitice şi lipolitice în circulație, producând leziuni la distanță. Eliberarea de substanțe vasoactive (histamina) şi peptide bradikininice produce vasodilatație, creşterea permeabilității vasculare şi exudarea lichidului şi proteinelor din spațiul intravascular în cel extravascular, cu hipovolemie consecutivă. Aceste fenomene conduc frecvent la apariția şocului.

Evoluția bolii poate fi apreciată prin criteriile descrise de Ranson şi Imrie, identificarea a 3 sau mai mulți factori de risc la internare (vârsta $\geq$ 55 de ani, leucocitoza $\geq$ 16000/mm^3, glicemia $\geq$ 200 mg%, LDH $\geq$350 U/L, AST$\geq$250 U/L) sau în primele 48 ore (calcemia $\leq$ 2 mM/L, uree $\geq$100 mg %, deficit de baze $\geq$ 4 mEq/L) fiind asociată cu o rată crescută a mortalității.

Markeri biochimici care pot prezice cu destulă acuratețe evoluția pacienților cu pancreatită acută sunt: proteina C reactivă, elastaza granulocitară serică şi peptidul activator al tripsinogenului urinar.

Tratamentul este conservativ, cu administrare de fluide şi coloizi pe cale intravenoasă pentru menținerea volemiei, suprimarea oricărui aport alimentar, aspirație nasogastrică şi analgezice. Opiaceele trebuie evitate, întrucât exacerbează afecțiunea. Anticolinergicele şi alte medicamente care blochează secreția pancreatică sunt ineficiente şi s-a demonstrat experimental că secreția pancreatică stimulată cu CCK este aproape abolită în cazul pancreatitei acute. Inhibitorii de proteaze, cum este aprotinina, sunt ineficienți în tratamentul pancreatitei acute.

22.4.4.2 Pancreatita cronică

Boala inflamatorie cronică a pancreasului se poate manifesta sub forma unor episoade de inflamație acută a unui pancreas afectat anterior sau ca o afectare cronică, cu durere persistentă sau malabsorbție. Malabsorbția se datorează digestiei incomplete a alimentelor, dar rezerva funcțională este considerabilă şi secreția enzimelor pancreatice trebuie să scadă sub 10% pentru a apărea steatoreea.

Cauzele de pancreatită cronică sunt similare cu cele ale pancreatitei acute, dar uneori au etiologie nedeterminată. În țările dezvoltate, alcoolismul reprezintă cea mai frecventă cauză de insuficiență pancreatică exocrină manifestă clinic la adult, în timp ce, la copii, cauza cea mai frecventă este fibroza chistică. În țările slab dezvoltate, malnutriția protein-calorică este o cauză frecventă.

Procesul fiziopatologic primar în pancreatita cronică este reprezentat de distrugerea celulelor parenchimului secretor exocrin. În cazul pancreatitei induse de consumul de alcool, s-a sugerat că defectul primar ar fi denaturarea proteinelor în canale. Obstrucția canalelor poate conduce la dilatarea acestora, atrofia difuză a celulelor acinare, fibroză şi calcificarea unor dopuri proteice, fenomen frecvent observat la radiografia abdominală simplă.

În general, pacienții cu pancreatită cronică nu au nivele serice crescute ale enzimelor pancreatice, ci, mai degrabă, valori sub cele normale. Pacienții cu pseudochisturi pancreatice, produse prin dilatarea ductelor, au creşteri cronice ale enzimelor pancreatice.

Tratamentul pancreatitei cronice implică tratamentul cauzei preexistente, în cazul în care aceasta este cunoscută şi tratamentul pe termen lung al consecințelor sale, de exemplu prevenirea malabsorbției prin administrarea orală de enzime pancreatice (afectarea glandei fiind ireversibilă).

22.4.4.3 Cancerul pancreatic

Cancerul pancreatic poate fi dificil de diagnosticat. Pacientul este adus la medic mai degrabă de către efectele apariției metastazelor decât de efectele directe ale tumorii. Pacientul poate prezenta durere abdominală, scădere ponderală şi icter. Icterul obstructiv apare în cazul prezenței unei tumori a capului pancreasului, care comprimă canalul coledoc. Malabsorbția produsă prin insuficiența exocrină consecutivă blocării ductului pancreatic şi compresiei coledocului, cu imposibilitatea ajungerii sărurilor biliare în duoden este un factor care contribuie semnificativ la scăderea ponderală. Cancerul pancreatic este, de obicei, diagnosticat târziu, când metastazele sunt, cel mai adesea, prezente şi nu mai pot fi făcute decât intervenții chirurgicale paleative.

Testul cu secretină-colecistochinină: în cancerul de pancreas scade volumul secreției cu păstrarea debitului bicarbonatului şi scăderea debitului de enzime. Testele secretorii, din cauza nespecificității lor sunt depăşite ca valoare diagnostică in comparație cu investigațiile imagistice. Ele permit doar afirmarea unei leziuni pancreatice cronice fără a permite deosebirea între pancreatita cronică şi cancerul pancreatic. Aceste teste pot fi anormale şi în alte cancere digestive şi în boli ale mucoasei intestinale însoțite de malabsorbție. Polipeptidul pancreatic PP care este produs în pancreas paralel cu producția de enzime, pledează împotriva cancerului pancreatic (dar şi împotriva pancreatitei cronice) când atinge niveluri serice peste 125 pg/mL în lipsa stimulării prin prânz ori secretină –colecistokinină. Aceste valori corespund unei producții de enzime normale şi, prin urmare, unui parenchim pancreatic neafectat. Amilaza, lipaza serică şi glicemia cresc în cancerul pancreatic, dar şi în pancreatită. Fosfataza alcalină serică poate precede cu 4-6 luni diagnosticul tumorii. Creşterea fosfatazei alcaline ca şi a bilirubinei şi a aspartat aminotransferazei pot traduce atât metastazele hepatice cât şi obstrucția subhepatică sau alte afecțiuni digestive asociate.

22.4.4.4 Fibroza chistică

Fibroza chistică este cea mai frecventă afecțiune metabolică moştenită, frecvența sa fiind de 1/2500 născuți vii. Este o boală genetică transmisă autozomal recesiv, care apare în urma alterării proteinei CFTR *(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)*, care intră în structura canalelor de clor la nivelul celulelor epiteliale. Transportul deficitar al clorului determină producerea de secreții vâscoase care blochează ductele secretorii ale glandelor exocrine şi arborele bronşic. Consecutiv acestui fenomen, pacienții fac infecții respiratorii repetate şi, datorită afectării arborelui biliar, sunt predispuşi la ciroză hepatică.

Insuficiența pancreatică apare la aproximativ 85% din cazuri. Malabsorbția poate fi prevenită prin administrarea orală a enzimelor pancreatice.

Insuficiența pulmonară este cea mai frecventă cauză de deces la aceşti pacienți.

22.4.5 Explorarea de laborator a funcțiilor pancreatice exocrine

Se face cu ajutorul următoarelor investigații:

a) Determinarea activității lipazei, a amilazei serice şi a amilazuriei;

b) Aprecierea capacității funcționale a pancreasului, prin determinarea activității lipazei şi amilazei serice, în urma stimulării pancreasului cu prostigmina, secretina sau pancreozimina/ colecistokinina purificată;

c) Determinarea activității reziduale a tripsinei şi a chimotripsinei (elastazei) în materiile fecale;

d) Determinarea aciditătii actuale (pH), a cantității bicarbonaților, a activității enzimelor pancreatice din sucul pancreatic/duodenal, extras prin sondă, în urma unei excitații locale cu eter etilic.

22.4.5.1 Determinarea amilazei serice

Cea mai mare cantitate de amilază din organism se găseşte în pancreas, dar şi alte țesuturi conțin amilază (spre exemplu, glandele parotide).

Nefiind absorbită prin mucoasa intestinală intactă, activitatea serică a amilazei este scăzută în mod normal, aceasta provenind din deversarea direct în sânge de către celulele acinare sau din drenajul limfatic al glandelor. În cazul obstrucției ductale şi/sau inflamației pancreasului sau a glandelor salivare, deversarea enzimei în sânge sau în căile limfatice creşte. Hiperamilazemie

mai poate apărea când permeabilitatea mucoasei intestinale creşte consecutiv ischemiei mezenterice sau în cazul perforaţiei intestinale când o cantitate mare de amilază ajunge în lichidul peritoneal şi, pe calea ductului toracic, în circulaţie.

Amilazemia a fost primul test utilizat în diagnosticul pancreatitei acute. Valorile de referinţă variază larg în funcţie de substratul folosit. Valorile crescute de peste trei ori faţă de normal sugerează diagnosticul de pancreatită acută, dacă se exclude afectarea francă a glandelor salivare şi perforaţia sau infarctul intestinal. Chiar dacă prezenţa pancreatitei rămâne evidentă, după 48-72 ore nivelul amilazei tinde să revină la normal, mai repede decât alte teste biochimice.

Creşterea amilazei totale serice şi urinare apare în multe alte boli în afara pancreatitei, cum ar fi: afecţiuni pancreatice (carcinom pancreatic, traumatisme pancreatice, obstrucţia canalului pancreatic), ale glandelor salivare (infecţii, traumatisme, iradiere), afecţiuni ale viscerelor abdominale (ulcer perforat, infarct mezenteric, apendicită acută, ocluzie intestinală), tumori maligne (pulmonare, ovariene, colonice, mamare), chist ovarian, sarcină ectopică ruptă. Insuficienţa renală însoţită de durere abdominală poate mima pancreatita acută, datorită scăderii clearance-ului proteinelor mici, inclusiv al amilazei. În acest caz, creşterea amilazemiei sub triplul valorilor normale exclude pancreatita. Pacienţii cu acidoză (pH arterial < 7,32) pot prezenta valori fals crescute ale amilazei serice. Pacienţii cu intoxicaţie alcoolică acută pot prezenta, în 10-40% din cazuri, creşteri ale amilazei totale, fără a avea pancreatită.

Creşterea amilazei de peste 20 ori valorile normale sugerează mai degrabă tumori maligne secretante de amilază, decât pancreatită acută.

Izoenzimele amilazei

Au fost descrise diverse tehnici de diferenţiere a amilazei pancreatice de cea salivară. Deşi au aceeaşi greutate moleculară şi antigenitate similară a porţiunii proteice, cele două izoenzime diferă prin conţinutul în carbohidraţi. Amilazele produse de trompa uterină, ficat şi plămân sunt în cantitate mică şi au proprietăţi similare cu amilaza salivară, de aceea termenul de „amilază de tip salivar" este folosit pentru a denumi amilaza din toate sursele extrapancreatice. Amilaza produsă de tumorile maligne are, în cele mai multe cazuri, caracteristicile amilazei de tip salivar.

Raportul clearance de amilază / clearance de creatinină (C_{Am}/C_{Cr})

Amilaza care apare în urină provine din sânge, prin filtrare glomerulară. La indivizii sănătoşi, raportul Cl_{Am}/Cl_{Cr} este 2-4%. În pancreatita acută, acest raport creşte până la 10%, din două motive. În primul rând, creşterea amilazemiei produce o intensificare a filtrării amilazei prin glomeruli. În al doilea rând, mecanismul normal de reabsorbţie tubulară a unei părţi din amilaza filtrată este depăşit. Acest clearance crescut coincide cu observaţia că amilaza urinară rămâne crescută cu câteva zile mai mult decât amilaza serică.

Creşterea raportului Cl_{am}/Cl_{cr} mai poate apărea în cetoacidoză diabetică, insuficienţă renală, mielom multiplu şi arsuri.

Scăderea raportului Cl_{am}/Cl_{cr} sub 1% apare în macroamilazemie. Aceasta este o situaţie în care amilaza normală serică se leagă de o proteină serică anormală, rezultând un complex cu greutate moleculară mai mare, care nu se filtrează la nivel glomerular şi, ca urmare, nivelul amilazei serice este crescut. Dacă aceşti indivizi se prezintă la medic cu dureri abdominale de cauză nonpancreatică, ei pot fi diagnosticaţi în mod eronat ca având pancreatită, dacă este utilizat ca parametru biochimic doar amilaza serică.

22.4.5.2 Lipaza serică

Singurul organ cu o activitate semnificativă a lipazei este pancreasul. Prin urmare, un nivel ridicat al lipazei serice este mai specific pentru pancreatită decât amilaza totală. Activitatea lipazei în plasmă rămâne ridicată mai mult timp decât cea a amilazei totale, dar este un indicator mai puţin sensibil al afectării pancreatice. Determinarea ambelor enzime creşte specificitatea diagnostică.

22.4.5.3 Tripsina imunoreactivă serică

Tripsina poate activa mai mulţi factori din cascada coagulării, putând produce coagulare in-

travasculară. Pentru ca, „in vitro", acest fenomen să nu se întâmple, α_1-antitripsina şi α_2-macroglobulina inactivează rapid tripsina eliberată în sânge. Prin urmare, determinarea nivelului tripsinei serice nu poate fi realizată prin teste care folosesc activitatea proteolitică a acesteia, ci prin metode imunologice. Intervalul de referinţă pentru tripsina imunoreactivă este 17-65 µg/L. Tripsina imunoreactivă este un indicator sensibil şi suficient de specific pentru pancreatită.

22.4.5.4 Testul de stimulare cu secretină

Secretina stimulează secreţia pancreatică de apă şi electroliţi. Cantităţile de electroliţi şi de suc secretate de pancreas după stimularea cu secretină se consideră a fi proporţionale cu masa ţesutului exocrin pancreatic viabil.

Testul de stimulare cu secretină este efectuat în cazul pacienţilor suspecţi de pancreatită cronică sau neoplasm pancreatic, aceştia prezentând dureri abdominale, scădere ponderală şi steatoree. Testul este contraindicat în prezenţa suspiciunii de pancreatită acută.

Testul se efectuează dimineaţa, după post nocturn. Pacientul este intubat cu o sondă cu dublu lumen poziţionată , sub ghidaj fluoroscopic, cu un orificiu în stomac şi cu unul în duoden, în apropierea ampulei Vater. Această sondă permite aspirarea separat a sucului gastric şi a sucului pancreatic. Pentru a împiedica sucul gastric să ajungă în duoden şi să neutralizeze o parte din bicarbonatul secretat de pancreas, în loc de sonda cu lumen dublu este indicat a se folosi o sondă multi-lumen prevăzută cu balonaşe gonflabile care să obstrueze pilorul şi duodenul distal.

După poziţionarea sondei, se aspiră conţinutul gastric şi duodenal reziduale, timp de 10-20 minute. Fluidul duodenal aspirat reprezintă secreţia bazală. Deoarece aspirarea cantităţii de lichid din duoden este foarte variabilă, după această procedură se introduce un marker neabsorbabil în lumenul duodenal. O recuperare de minim 85% din marker de-a lungul testului este considerată adecvată pentru a analiza secreţia pancreatică aspirată.

Se administrează secretină intravenos în doză de 1 unitate clinică / kg şi apoi se aspiră continuu 4 probe de suc timp de 20 minute pentru fiecare. Probele trebuie păstrate la congelator până în momentul analizării lor.

Pentru a cuantifica răspunsul la secretină este folosită în mod convenţional secreţia de bicarbonat în lumenul duodenal. Testul este slab standardizat, iar rezultatele obţinute variază larg, fiind greu de comparat, datorită multitudinii de factori care le influenţează: produsul hormonal utilizat, doza şi modalitatea sa de administrare (intravenos în bolus sau în perfuzie, subcutanat).

Valorile normale sunt următoarele: volumul secreţiei mai mare de 2 mL/kg în 80 minute, concentraţia bicarbonatului cel puţin 80 mEq/L (80 mmol/L) şi un debit de bicarbonat mai mare de 10 mEq (10 mmol) în 30 minute.

Rezultate inferioare acestor valori sugerează disfuncţie pancreatică. Rezultate eronate pot fi obţinute în cazul pătrunderii sucului gastric în duoden în cursul testului, scăzând nivelul de bicarbonat măsurat. Recoltarea incompletă a secreţiei pancreatice conduce la o subevaluare a volumului secretor. Utilizarea seringilor sau a perfuzoarelor de plastic scade nedorit doza de secretină administrată, deoarece acestea leagă hormonul. Acest fapt este împiedicat prin amestecarea preparatului hormonal cu albumină.

Vagotomia, medicaţia anticolinergică şi boala Crohn duc la scăderea secreţiei de bicarbonat fără o boală pancreatică asociată.

22.4.5.5 Testul de stimulare cu secretină şi colecistokinină

Pentru a determina şi activitatea secretorie enzimatică pancreatică, în afară de apă şi electroliţi, după stimularea cu secretină se efectuează la 30 minute stimularea cu CCK administrată intravenos.

Intervalul răspunsului normal la acest test este foarte larg.

În insuficienţa pancreatică exocrină cronică se observă o scădere a secreţiei bicarbonatului, secreţia enzimatică fiind, de asemenea, redusă. Rezultate anormale sunt găsite şi în caz de cancer al capului pancreasului. În acest caz, secreţia enzimatică este mai afectată decât cea a electroliţilor.

Sensibilitatea acestui test în diagnosticul insuficienței pancreatice exocrine este de aproximativ 85%, iar specificitatea de 90%. Deoarece intubarea este puțin tolerată de pacienți, se poate determina activitatea enzimelor în scaun, cu o sensibilitate mai mică decât a aspiratului duodenal. Dintre enzimele pancreatice, activitatea în scaun a chimotripsinei se corelează cel mai bine cu valorile din aspiratul duodenal.

22.4.5.6 Testul Lundh

Acest test este o alternativă mai simplă la testul de stimulare cu secretină – CCK, utilizând mai puține resurse și stimularea secreției pancreatice fiind mai fiziologică.

Duodenul este intubat cu o sondă cu lumen simplu. După aceea, pacientul ingeră o masă de 300 mL conținând 15% carbohidrați, 6% lipide și 5% proteine. Conținutul duodenal este aspirat timp de 2 ore. Din sucul recoltat se determină activitatea tripsinei și lipazei / amilazei, precum și concentrația bicarbonaților.

Dacă testul este efectuat corect, sensibilitatea sa se apropie de cea a testului cu secretină – CCK, dar specificitatea este mai mică.

Pentru ca testul Lundh să poată fi efectuat, mucoasa duodenală a pacientului trebuie să fie intactă, deoarece ea produce secretina și CCK necesare stimulării pancreasului. De asemenea, eliberarea secretinei presupune ca acidul gastric să ajungă în duoden, prin urmare rezultatele testului sunt eronate la pacienți cu rezecție gastrică sau aclorhidrie.

22.4.5.7 Testul de hidroliză a tripeptidelor

Acest test evaluează în mod indirect funcția pancreatică exocrină.

Pacientului i se administrează oral un tripeptid sintetic, Acid N-Benzoil-L-Tirozil-ParaAminoBenzoic (BT-PABA), împreună cu o masă care să stimuleze secreția pancreatică. BT-PABA este hidrolizat de către chimotripsină, iar acidul paraaminobenzoic (PABA) este eliberat, absorbit din intestin, conjugat cu glicina în ficat și eliminat în urină, unde poate fi dozat. Înainte de a începe testul, se recoltează, pentru control, o probă de urină produsă într-o oră.

După administrarea tripeptidului, se recoltează urina timp de 6 ore. Până la momentul determinării PABA, urina este păstrată congelată, în tuburi cu EDTA.

Pentru a crește sensibilitatea testului, împreună cu BT-PABA este administrată, în masa ingerată, și cazeină, care inhibă competitiv chimotripsina.

Cantitatea de PABA excretată în urină este, în medie, 60% din doza administrată oral. La pacienții cu insuficiență pancreatică, excreția PABA este mult scăzută.

Cu 24 ore înainte de începerea testului este suspendată medicația care poate influența funcția pancreatică. Sulfonamidele, acetaminofenul și unele diuretice, precum tiazidele și furosemidul, interferă cu determinarea spectrofotometrică a PABA. De asemenea trebuie evitate înaintea testului fructele care conțin precursori ai acidului hipuric: prune, mure.

La pacienții cu afectare a absorbției intestinale sau cu afecțiuni renale, rezultatele pot fi fals scăzute.

Pentru a elimina factorii extrapancreatici, BT-PABA poate fi administrat împreună cu o cantitate de PABA marcat cu ^{14}C. Se calculează raportul între PABA excretat și PABA ingerat și între ^{14}C excretat și ^{14}C ingerat. Raportul celor 2 rezultate este mai mare de 0,76 la indivizii sănătoși și sub 0,76 în caz de insuficiență pancreatică. Folosirea ^{14}C în test îi crește sensibilitatea și specificitatea până la 90% în diagnosticul insuficienței pancreatice exocrine. Dezavantajele acestei variante includ imposibilitatea folosirii în sarcină și necesitatea prezenței unui echipament de măsurare a radiațiilor β.

22.4.5.8 Testul cu dilaurat de fluoresceină

Dilauratul de fluoresceină este un compus sintetic care poate fi hidrolizat de către colesterol esteraza pancreatică. Fluoresceina este eliberată, absorbită în intestin, conjugată în ficat cu acidul glucuronic și excretată în urină, unde poate fi dozată.

Activitatea esterazei pancreatice este dependentă de prezența sărurilor biliare, prin urmare un diagnostic eronat de insuficiență pancreatică poate fi pus în cazul deficitului de excreție a sărurilor biliare.

Pentru a elimina influența altor factori în afara hidrolizei compusului administrat, se poate determina nivelul de fluoresceină excretat în urină după administrarea, a doua zi, a unei cantități de fluoresceină liberă echivalentă cu cea din prima zi. Un raport între cantitatea de fluoresceină excretată în prima zi și cantitatea excretată a doua zi mai mare de 30% apare în cazul unei funcții pancreatice normale, în timp ce un raport sub 20% sugerează insuficiență pancreatică.

Acest test este mai puțin convenabil decât cel cu BT-PABA, deoarece necesită două zile pentru a fi pus în practică.

Bibliografie selectivă

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Cucuianu M., Crîsnic I., Pleșca-Manea Luminița – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică,* 2003.
4. Devlin T. – *Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992.
5. Fischbach F. – *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
6. Guyton A. C. – *Textbook of Medical Physiology,* Ed. 7, W.B.Saunders Company, 1986.
7. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991.
8. Kaplan A.L., Pesce J.A. – *Clinical Chemistry - theory, analysis and correlation*, Mosby Co, 1984.
9. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996.
10. Marshall W., Bangert S. – *Clinical Chemistry,* Ed.5, Mosby, 2004.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 23. Biochimia inimii

Dan Dobreanu

Inima este un organ musculo-cavitar funcționând ca un sistem de două pompe așezate în serie, având rolul de a împinge în circulație o cantitate de sânge adecvată necesităților metabolice ale organismului. Pentru a funcționa în acest mod, celulele miocardice sunt celule excitabile, posedând ca și proprietate specifică contractilitatea. Aceasta definește capacitatea celulei miocardice de a genera lucru mecanic prin interacțiunea proteinelor contractile, proces consumator de energie, generată prin intermediul metabolismului miocardic.

23.1 Biochimia contracției miocardice

Miocitele reprezintă celulele contractile miocardice, formând cea mai mare parte din masa miocardului, la om numărul lor fiind în jur de 10^{11}. Au o formă alungită cu o lungime de 80-120 μm și un diametru de 10-15 μm. Sunt înconjurate de o membrană numită sarcolemă, care delimitează citoplasma (sarcoplasma) conținând nucleu și numeroase organite celulare.

23.1.1 Organizarea microscopică a aparatului contractil

Miofibrilele reprezintă aparatul contractil al celulelor miocardice formând aproximativ 50 % din masa celulară. În vecinătatea lor se găsesc **mitocondriile**, formând aproximativ 30 % din masa celulelor și având rolul de a furniza pe calea glicolizei aerobe energia necesară pentru contracție.

Examinate microscopic miofibrilele prezintă ca și în cazul mușchiului scheletic un **aspect striat**, datorită alternanței unor benzi cu aspect caracteristic:

- **banda A** (întunecată), anizotropă în lumină polarizată și intens colorabilă cu eozină; este bisectată de o bandă mai clară, numită banda H (Hensen) care la rândul ei este bisectată de o bandă întunecată, M (Mittelinien).
- **banda I** (clară), izotropă în lumină polarizată, slab colorabilă cu eozină și bisectată de o linie mai întunecată numită banda Z (Zwischen).

Striarea (bandarea) materialului contractil are la bază interdigitarea dintre două tipuri de filamente; cum în microscopia electronică deosebirea cel mai ușor de surprins între aceste filamente este cea de grosime, ele sunt cunoscute sub denumirea de filamente groase (10-12 μm) și filamente subțiri (5-6 μm).

La nivelul benzii I se găsesc numai filamente subțiri în timp ce filamentele groase sunt dispuse numai la nivelul benzii A, aici ele fiind în cea mai mare parte întrepătrunse printre filamentele subțiri. Pe secțiune transversală se constată că la

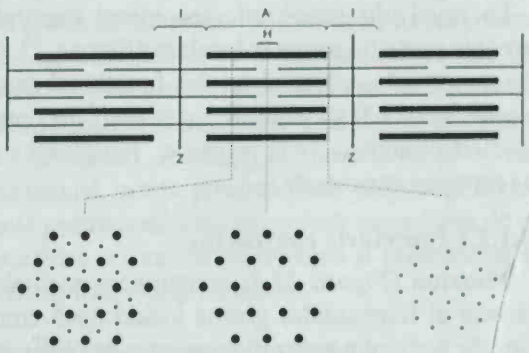


Figura 23.1. Dispoziția filamentelor subțiri și groase la nivelul miofibrilelor *(după Sabău, 1999)*

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

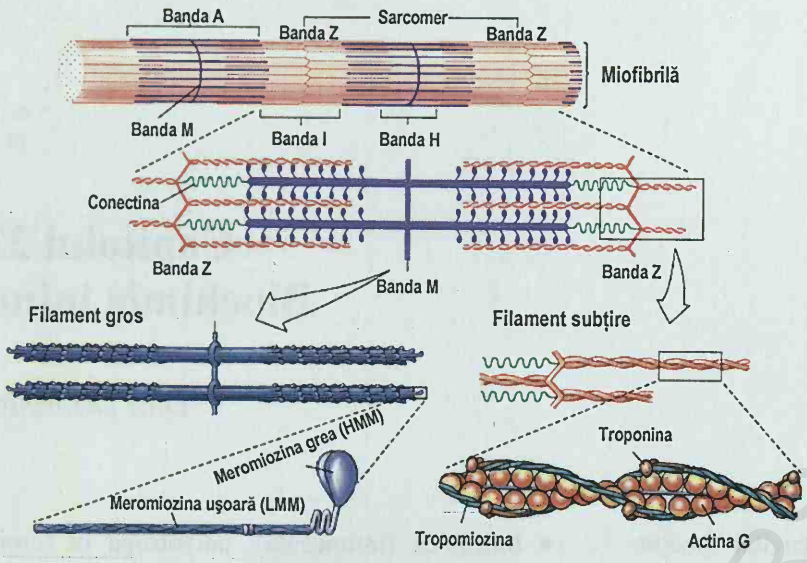


Figura 23.2. Structura sarcomerului la diferite niveluri de organizare *(explicațiile în text).*

nivelul benzii A dispoziția tridimensională a miofilamentelor are un înalt grad de ordonare, fiecare filament gros având în jurul său 6 filamente subțiri şi fiecare filament subțire având în jurul său 3 filamente groase (*Figura 23.1).*

Sarcomerul este unitatea fundamentală de organizare ultrastructurală a aparatului contractil al fibrei miocardice, reprezentând porțiunea delimitată între două benzi Z succesive. Prin urmare un sarcomer este alcătuit din două jumătăți de bandă I la extremități şi o bandă A în centru. Lungimea sarcomerului este de 1,8-2,2 μm.

23.1.2 Organizare ultrastructurală a sarcomerului

La nivel ultrastructural sarcomerul cuprinde agregate proteice supramoleculare (*Figura 23.2*). Din punctul de vedere al rolului funcțional aceste proteine pot fi grupate în 3 categorii: (•) proteine contractile, (•) proteine reglatoare şi (•) proteine structurale.

23.1.2.1 Proteinele contractile

Miozina (*Figura 23.3)* constituie principalul element al filamentelor groase având două componente denumite meromiozine care se obțin experimental prin degradarea enzimatică produsă de tripsină sau chimotripsină.

Meromiozina ușoară (light meromyosine - LMM) este situată în porțiunea centrală a miofilamentului agregându-se cu celelalte lanțuri de meromiozină ușoară pentru formarea filamentului gros.

Meromiozina grea (heavy meromyosine - HMM) formează capătul moleculei de miozină care se detaşează din filamentul gros formând punți transversale cu actina. Meromiozina grea este formată din 2 subfragmente ce se pot izola experimental sub acțiunea enzimatică a papainei:

- **subfragmentul 2** (S2) formează "brațul" moleculei de miozină cu o structură asemănătoare cu a meromiozinei ușoare
- **subfragmentul 1** (S1) formează "capul" moleculei de miozină, de formă globulară, la nivelul căruia sunt localizate proprietățile fundamentale ale acesteia: activitatea ATP-azică şi capacitatea de a interacționa cu actina.

Din punctul de vedere al alcătuirii polipeptidice, molecula de miozină conține două lanțuri grele şi patru lanțuri ușoare.

Lanțurile grele ale miozinei (GM ≈ 200 kDa) spiralate în α-helix, constituie cea mai mare parte a moleculei de miozină. Din punctul de vedere al compoziției în aminoacizi, lanțurile grele ale moleculei de miozină pot fi de două tipuri (α şi β), diferite între ele în ce priveşte viteza activității ATP-azice, mai mare pentru tipul α. După posibilitatea de combinare a celor două tipuri de lanțuri grele există trei **izoenzime miozinice** diferind în ce priveşte viteza activității ATP-azice: (•) izoenzima V1, formată din 2 lanțuri α, (•) izoenzima V2, formată din un lanț α şi unul β, (•) izoenzima V3, formată din 2 lanțuri β.

La nivelul miocardului atrial predomină izoenzima V1, explicând viteza mai mare a contracției la acest nivel, iar în miocardul ventricular tipul de izoenzimă depinde de dimensiunile animalului, la cele mici predominând tipul V1 iar la cele mari tipul V3. La om există mixtură a izoenzimelor V1, V2 şi V3, iar anumite situații patologice determină sinteza preferențială a unei izoenzime sau alteia. De exemplu în cazul hipertrofiei ventriculare se sintetizează preferențial izoenzima V3 permițând o contracție mai economică, ca un adevărat mecanism de adaptare moleculară.

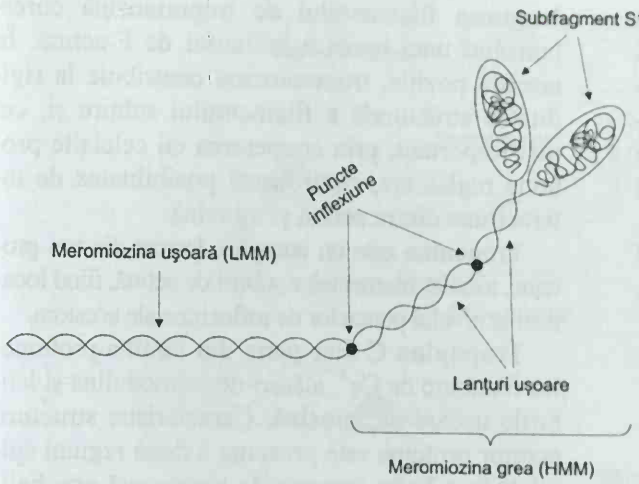


Figura 23.3. Structura miozinei cu porţiunile uşoară (LMM) şi grea (HMM), subfragmentele S1 şi S2 şi punctele de inflexiune *(modificat după Katz, 2006)*

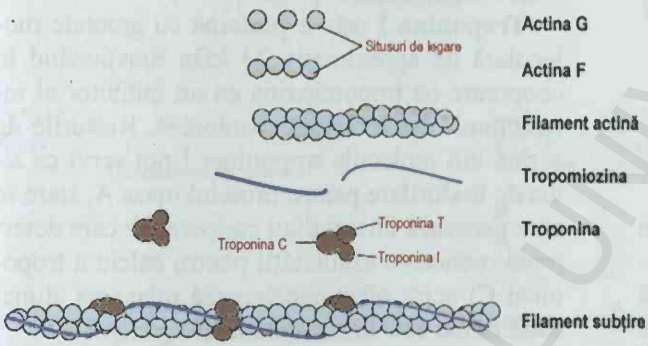


Figura 23.4. Organizarea moleculară a filamentelor subţiri.

Un aspect important al structurii moleculare al miozinei, considerat cheie în mecanismul contracţiei, îl reprezintă existenţa la nivelul lanţurilor polipeptidice grele a două **regiuni de flexibilitate**, datorită absenţei la acest nivel a configuraţiei rigide de tip α-helix. Aceste regiuni de flexibilitate corespund punctelor de clivaj sub acţiunea enzimatică a tripsinei şi papainei, situându-se ca urmare la nivelul zonei de separare între meromiozina grea şi uşoară şi la nivelul separaţiei dintre subfragmentele S1 şi S2. Datorită existenţei acestor regiuni de flexibilitate unghiul dintre componentele miozinei se poate modifica jucând rol în mecanismul scurtării fibrei miocardice.

Lanţurile uşoare ale miozinei (GM ≈ 20 kDa) sunt dispuse în jurul celor grele în regiunea "gâtului" moleculei de miozină (*Figura 23.4*). Din punct de vedere funcţional aceste lanţuri sunt incluse în categoria proteinelor "fixatoare de Ca^{2+}" cum sunt troponina C şi calmodulina. În multiple ţesuturi, inclusiv inima, lanţurile uşoare ale miozinei nu mai leagă Ca^{2+} deoarece unii aminoacizi cheie din structura domeniului fixator de Ca^{2+} au fost eliminate pe parcursul evoluţiei, dar cu toate acestea ele continuă să joace un rol important în controlul contracţiei. Nomenclatura lanţurilor uşoare ale miozinei s-a modificat în timp fiind, din acest motiv destul de confuză. Două lanţuri uşoare sunt considerate **esenţiale**, întrucât extracţia lor chimică determină denaturarea moleculului de miozină; ele sunt adesea desemnate cu numele de MLC-1 (myosin light chain-1). Celelalte două lanţuri uşoare (MLC-2) sunt considerate **reglatoare**, extracţia lor nedeterminând inactivarea miozinei. La anumite specii de nevrtebrate, fixarea Ca^{2+} la nivelul MLC-2 joacă rolul esenţial în cuplarea excitaţie-contracţie. Chiar dacă la om MLC-2 şi-a pierdut capacitatea de fixare a Ca^{2+}, la acest nivel există situsuri de fosforilare pentru diverse proteinkinaze Ca^{2+}-dependente. În muşchiul neted fosforilarea MLC-2 joacă un rol esenţial declanşarea contracţiei, în timp ce la nivel miocardic rolul acesteia în controlul forţei de contracţie este mai puţin bine determinat. Mutaţii în structura acestor lanţuri întâlnite în anumite forme de cardiomiopatie pot însă altera răspunsul contractil la tahicardie.

Actina reprezintă principalul component al filamentelor subţiri, având un capăt fixat la nivelul membranei Z în timp ce celălalt alunecă printre filamentele de miozină. Molecula de actină este mult mai mică decât cea de miozină având o greutate moleculară de aproximativ 42 kDa. De asemenea, spre deosebire de molecula alungită a miozinei, actina este o proteină globulară, având un diametru de » 55 Å. Ea este stabilă in vitro atât sub formă de monomer, denumit **actina G** (globulară), cât şi sub forma **actinei F** (fibrilară), forma polimerică caracteristică in vivo. Actina fibrilară este formată din 2 lanţuri de monomeri care se răsucesc în helix, punctele de inflexiune fiind plasate pe distanţa a 7 monomeri de actină, la intervale de 35-40 nm. Funcţional, actina prezintă două proprietăţi importante pentru contracţia musculară: capacitatea de interacţiune reversibilă cu miozina şi posibilitatea de activare a ATP-azei miozinice.

23.1.2.2 Proteinele reglatoare

Tropomiozina este o moleculă sub formă de filament, având o lungime de aproximativ 400 Å. Are o structură dublu helicoidală, fiind formată din două lanţuri polipeptidice unite prin punţi di-

sulfidice care asigură rigiditatea structurii. Din punctul de vedere al secvenței polipetidice a lanțurilor au fost identificate două isoforme numite α- şi β-tropomiozină, având greutatea moleculară de 34 kDa respectiv 36 kDa, molecula de tropomiozină fiind un homo- sau heterodimer al celor două isoforme. În structura sarcomerului, tropomiozina este situată longitudinal în şanțul dintre cele două lanțuri spiralate de F-actină,

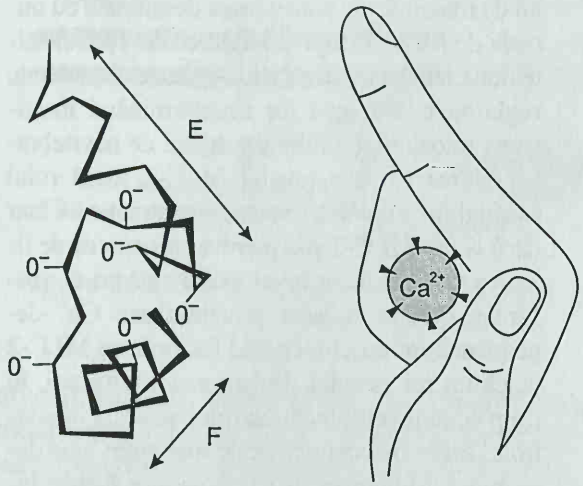


Figura 23.5. Structura situsului fixator de Ca^{2+} din molecula de troponină cuprinde două regiuni spiralate în α-helix (notate E şi F), unite printr-o secvență non-helicală. Această structură exteriorizează şase atomi de oxigen (O^-) care fixează puternic ionul de calciu (Ca^{2+}). Deoarece structura seamănă cu mâna dreaptă, proteinele care o conțin sunt desemnate cu numele de „EF-hand proteins" *(după Katz, 2006).*

lungimea filamentului de tropomiozină corespunzând unei bucle a helixului de F-actină. În această poziție, tropomiozina contribuie la rigiditatea structurală a filamentului subțire şi, cel mai important, prin cooperarea cu celelalte proteine reglatoare, controlează posibilitatea de interacțiune dintre actină şi miozină.

Troponina este un complex format din trei proteine, asociat filamentelor subțiri de actină, fiind localizat la nivelul punctelor de inflexiune ale acestora.

Troponina C face parte din familia proteinelor fixatoare de Ca^{2+} alături de calmodulină şi lanțurile uşoare de miozină. Caracteristic structurii acestor proteine este prezența a două regiuni spiralate în α-helix separate de o secvență non-helicală. La acest nivel, aranjamentul unor aminoacizi conținând oxigen formează o adevărată "pungă" la nivelul căreia ionul de Ca^{2+} este fixat cu foarte mare afinitate *(Figura 23.5).*

Troponina I este o proteină cu greutate moleculară de aproximativ 23 kDa funcționând în cooperare cu tropomiozina ca un inhibitor al interacțiunii dintre actină şi miozină. Resturile de serină din molecula troponinei I pot servi ca situs de fosforilare pentru proteinkinaza A, stare în care generează interacțiuni cooperative care determină reducerea afinității pentru calciu a troponinei C; acest efect accelerează relaxarea atunci când inima este influențată de β-agonişti.

Troponina T, cea mai mare dintre cele trei molecule de troponină, este o moleculă asimetrică funcționând ca un liant care fixează componentele filamentului subțire una de alta. Există un mare număr de isoforme ale troponinei T, numai patru dintre ele fiind identificate în inima umană normală. Cu toate că troponina T nu fixează Ca^{2+}, efectele sale alosterice asupra filamentului subțire influențează sensibilitatea pentru Ca^{2+} şi posibilitatea dezvoltării tensiunii. Aceasta explică de ce tranziția de la o isoformă a troponinei T la alta poate modifica contractilitatea miocardică.

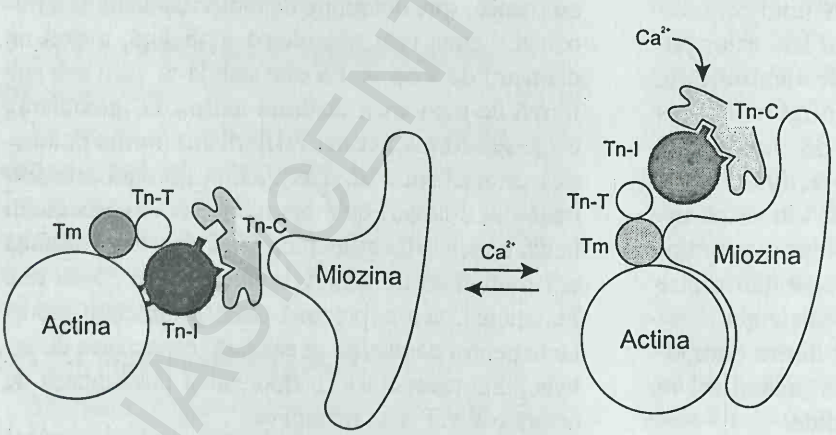


Figura 23.6. Efectul Ca^{2+} asupra interacțiunii dintre actină şi miozină.
Atunci când concentrația citosolică este mică, troponina C (Tn-C) are o interacțiune slabă cu troponina I (Tn-I) care blochează interacțijne dintre actină şi miozină. Atunci când concentrația Ca^{2+} este mare, el se fixează pe troponina C care interacționează cu troponina I, „deblocând" accesul miozinei la actină *(după Opie, 2004).*

Rolul complexului troponină-tropomiozină este acela de a realiza controlul interacțiunii dintre actină şi miozină şi deci al contracției miocardice (*Figura 23.6*):

- în starea de **relaxare**, la o concentrație scăzută a Ca^{2+} intrace-

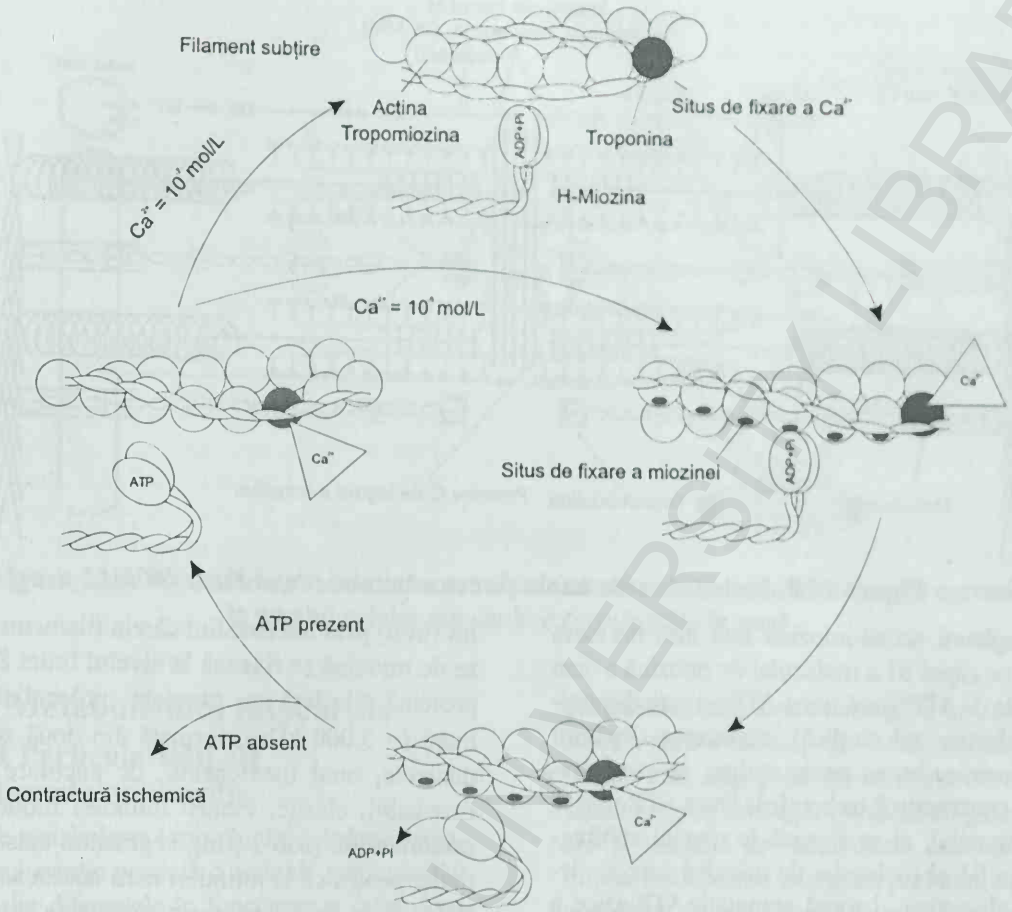


Figura 23.7. Secvența fenomenelor prin care se realizează contracția miocardică *(după Bullock, 1994)*

lular, troponina C nu fixează Ca^{2+} și ca urmare tropomiozina ocupă între filamentele subțiri de actină o poziție de blocare care împiedică steric interacțiunea dintre actină și miozină.

- în timpul **contracției**, declanșată prin creșterea Ca^{2+} intracelular, prin legarea acestuia de troponina C se produce o modificare a conformației moleculare determinând deplasarea tropomiozinei din poziția inițială; această nouă poziție face posibilă interacțiunea dintre actină și miozină, prin expunerea locului de fixare al miozinei de pe suprafața G-actinei; ca urmare se poate considera că în mecanismul contracției Ca^{2+} are un efect derepresor împiedicând mecanismele care nu permit interacțiunea dintre actină și miozină.

23.1.2.3 Mecanismul contracției miocardice

Dacă troponina și tropomiozina sunt responsabile de reglarea contracției miocardice în funcție de disponibilul de Ca^{2+} intracelular, în ce privește mecanismul scurtării propriu-zise a fibrelor miocardice, teoria cea mai acceptată actualmente este cea a **punților transversale**, propusă de Huxley (1957). În esență, această teorie susține formarea și desfacerea repetitivă-ciclică a unor punți transversale între filamentele subțiri de actină și cele groase de miozină, realizate prin intermediul subfragmentului S1 al meromiozinei grele.

Secvența în care se realizează aceste fenomene este următoarea (*Figura 23.7*):

- "capul" S1 al meromiozinei care conține fixat ADP și fosfat anorganic, poate interacționa cu o actină prin legături de tip electrostatic, situsul de fixare fiind însă în condiții de repaus mascat de tropomiozină. Fixarea Ca^{2+} la nivelul troponinei C duce la o modificare conformațională care permite interacțiunea dintre actină și miozină, urmată de modificarea unghiului dintre "capul" și "gâtul" moleculei de miozină la nivelul regiunii de flexibilitate de la acest nivel. Această modificare a unghiului tracționează actina spre mijlocul sarcomerului, realizând așa-numitul **mecanism glisant**
- formarea legăturii dintre actină și miozină este urmată de eliberarea ADP-ului și a fosfatului anorganic de la nivelul capului miozinic. Pentru desfa-

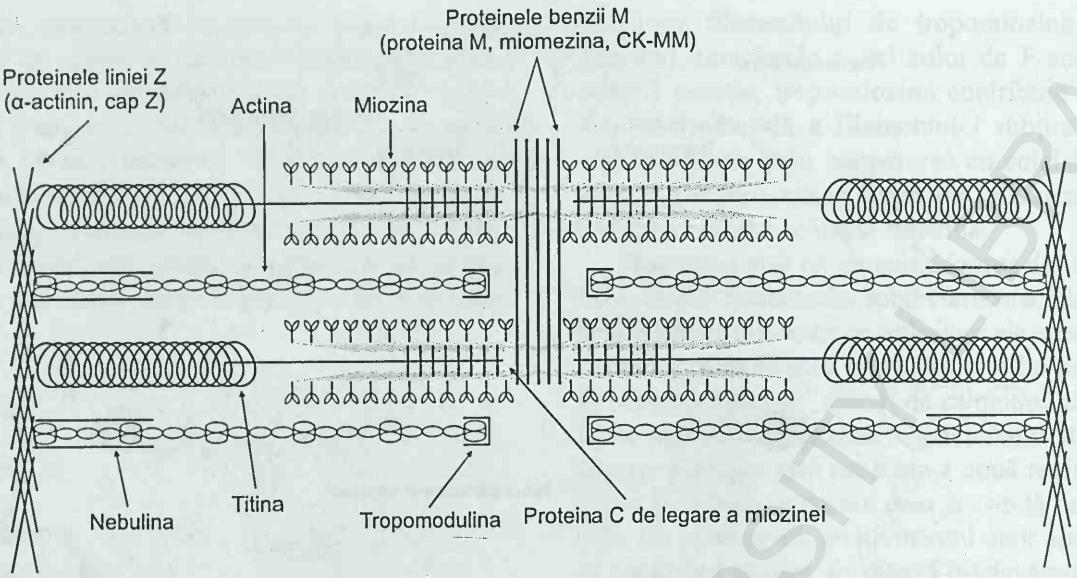


Figura 23.8. Proteinele structurale ale sarcomerului *(după Katz, 2006).*

cerea legăturii actină-miozină este însă necesară fixarea pe capul S1 a moleculei de miozină a unei molecule de ATP; dacă acest ATP nu este disponibil (ischemia miocardică) desfacerea legăturii acto-miozinice nu se poate realiza, apărând aşa-numita **contractură ischemică.** Dacă ATP-ul este însă disponibil, el se fixează la nivelul subfragmentului S1 al moleculei de miozină care se detaşează de actină; datorită activităţii ATP-azice a subfragmentului S1 al miozinei ATP-ul este scindat cu generare de ADP şi fosfat anorganic.

- fenomenul continuă atâta timp cât concentraţia Ca^{2+} la nivelul sarcomerului se menţine ridicată, complexul troponină-tropomiozină permiţând realizarea interacţiunii dintre actină şi miozină. Prin succesiunea repetitivă a formării şi desfacerii punţilor transversale acto-miozinice se produce alunecarea filamentelor subţiri în interiorul discurilor întunecate, având ca efect scurtarea sarcomerului.

23.1.2.4 Proteinele structurale

Cuprind numeroase tipuri de proteine, unele insuficient caracterizate, care deşi nu participă în mod direct la contracţie, au un rol important în dezvoltarea forţei la nivelul sarcomerului prin poziţionarea şi fixarea elementelor contractile. După localizarea lor la nivelul sarcomerului, au fost fost descrise trei grupe de proteine structurale: cele ataşate filamentelor groase, filamentelor subţiri şi liniei Z (*Figura 23.8*).

Cel puţin cinci proteine strucurale au fost identificate la nivelul filamentelor groase. Cea mai importantă proteină de acest fel este **conectina** (titin) prin intermediul căreia filamentele groase de miozină se fixează la nivelul liniei Z. Este o proteină fibrilară cu greutate moleculară foarte mare (≈ 3.000 kDa), formată din două segmente distincte, unul inextensibil, de ancorare şi altul extensibil, elastic. Pentru întinderi moderate ale sarcomerului (sub 2 μm), segmentul elastic se întinde, pentru ca la întinderi mari acesta să se pună în tensiune. Acest comportament este responsabil de relaţia lungime-tensiune pasivă a fibrei miocardice. **Myosin binding protein C** leagă conectina de filamentele groase, prezentând o serie de situsuri de fosforilare care au rol în reglarea contractilităţii. Mutaţii în structura acestei proteine sunt asociate cu unele forme de cardiomiopatie hipertrofică. La nivelul benzii M se găsesc **proteina M şi myomesina** care stabilizează filamentele groase, având probabil rol şi în miofibrilogeneză. O altă proteină, isoforma **MM a creatinfosfokinazei** se află de asemenea la nivelul benzii M.

La nivelul filamentelor subţiri s-a identificat o proteină înrudită cu **nebulina** de la nivelul muşchiului scheletic, ce se întinde de-a lungul axului filamentelor subţiri, din spre linia Z în spre interiorul benzii I. **Tropomodulina** este o proteină „capişon" ce se găseşte la la capetele filamentului subţire, acoperind capătul polimerului de F-actină şi fiind responsabilă de lungimea filamentului subţire.

La nivelul liniei Z se găsesc **α-actinina** şi **cap Z** (numită şi β-actinină), ambele înrudite cu topomodulina şi fiind fiind fixate la terminarea filamentelor subţiri în interiorul linei Z.

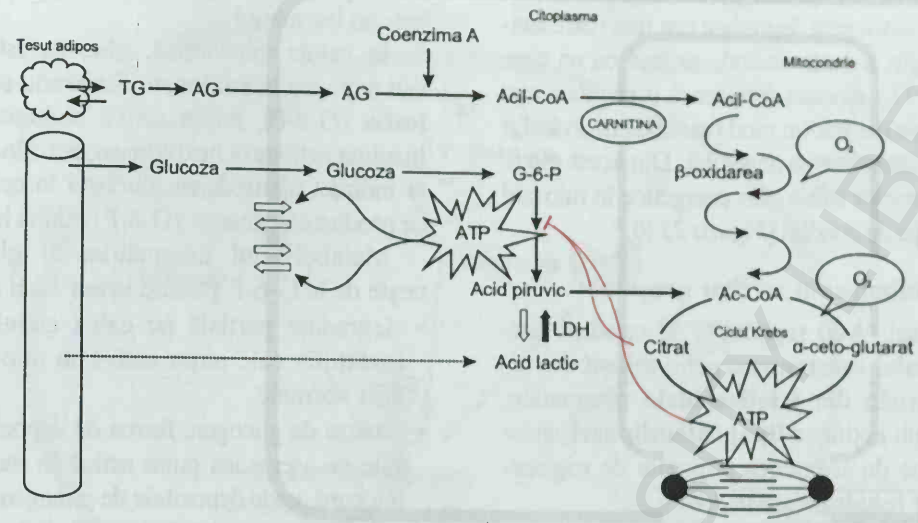


Figura 23.9. Prezentarea schematică a principalelor căi metabolice active în mod normal la nivelul celulei miocardice *(explicațiile în text)*

23.2 Metabolismul miocardic

23.2.1 Particularități ale metabolismului miocardic

Față de metabolismul mușchiului scheletic, metabolismul miocardic prezintă o serie de particularități rezultând din diferențele în funcționarea celor două categorii de mușchi. Astfel, mușchiul scheletic dezvoltă forță în mod exploziv într-un interval de timp scurt, urmată o perioadă lungă de relaxare, în timp ce miocardul dezvoltă forță ritmic, dar în mod continuu. Ca urmare, mușchiul scheletic prezintă un metabolism predominant anaerob, având posibilitatea ca în timpul activității să furnizeze energia în mod rapid, prin acumularea așa-numitei "datorii de O_2" (o cantitate de acid lactic formată în mușchi ca urmare a glicolizei anaerobe și care va fi metabolizat apoi în repaus prin glicoliză aerobă). Miocardul în schimb, neavând o fază de relaxare prelungită, nu are nici posibilitatea de a acumula datorie de O_2, metabolismul său fiind predominant aerob. Datorită acestui fapt miocardul prezintă o serie de adaptări legate de:

- **posibilitatea de aport a O_2**; la nivelul miocardului, coeficientul de extracție al O_2 din sângele arterial este foarte mare (50-75% față de 25% la nivelul circulației sistemice), sângele venos coronarian având o saturație relativ scăzută de O_2. Acesta face imposibilă o creștere a coeficientului de extracție în cazul unei suprasolicitări, miocardul fiind extrem de sensibil la tulburările circulației coronariene. În plus, celula miocardică conține cantități mari de mioglobină, cromoproteină asemănătoare hemoglobinei, care poate stoca anumite cantități de O_2 la acest nivel.
- **substratul energetic** folosit; față de mușchiul scheletic care folosește preferențial glucoza care are și variantă de metabolism anaerob, pentru miocard substratul energetic preferențial este reprezentat de acizii grași, care prin degradare furnizează o mare cantitate de energie, având însă metabolism exclusiv aerob.
- **echipamentul enzimatic**; datorită metabolismului său, miocardul are foarte bine dezvoltate enzimele ciclului Krebs și ale fosforilării oxidative; cum acestea sunt localizate exclusiv mitocondrial, miocardul este foarte bogat în aceste organite celulare, care ocupă aproximativ 30% din volumul celular.

23.2.2 Utilizarea substratelor de către miocard

Producerea energiei se face prin degradarea substratelor metabolice, miocardul putând utiliza în acest scop acizi grași (AG), glucoza, lactatul și în mai mică măsură, corpii cetonici și aminoacizi. Înainte de a fi utilizați de celula miocardică, AG și glucoza pot fi stocați la acest nivel sub formă de trigliceride respectiv glicogen; depozitele sunt însă mici, miocardul fiind dependent de aportul permanent de substanțe energetice, realizat prin circulația coronariană.

Pentru fiecare categorie de substrat energetic este importantă atât **valoarea energetică** (cantitatea de energie produsă prin degradare) cât și **costul energe-**

tic (consumul de O_2 necesar pentru degradare). Astfel, AG furnizează prin degradare cea mai mare cantitate de energie, aceasta făcându-se însă cu un consum mare de O_2; glucoza furnizează o cantitate mai mică de energie dar într-un mod mai eficient, având şi varianta de metabolizarea anaerobă. Din acest motiv ponderea diverselor substraturi energetice în miocard diferă în funcţie de condiţii (*Figura 23.9)*.

23.2.2.1 Metabolismul acizilor graşi

Acizii graşi (AG) reprezintă în condiţii normale principalul substrat energetic folosit de miocard. Ei provin din **trigliceridele** plasmatice, hidrolizate sub acţiunea **lipoproteinlipazei**; miocardul conţine de asemenea depozite de triglyceride, care pot fi hidrolizate în AG.

Captarea AG de către ţesuturi, inclusiv miocardul, se face pasiv, pe baza diferenţelor de concentraţie, fiind extrem de rapidă, cu un timp de înjumătăţire al AG plasmatici de aproximativ 2 minute.

În celula miocardică, AG formează un complex cu **coenzima A** (CoA) rezultând **Acil-CoA,** forma activă metabolic a AG. Enzimele degradării Acil-CoA sunt localizate strict intramitocondrial, pentru metabolizarea acesteia fiind deci necesar transferul prin membrana mitocondrială. Acest transfer se realizează numai după legarea grupării acil de **carnitină** (aminoacid cu 7 atomi de carbon) care joacă rolul unui "căruş" care transportă AG în mitocondrie, necesitând prezenţa transferaze localizate la nivelul membranei mitocondriale. În mitocondrie AG sunt degradaţi pe **calea beta-oxidării,** care îndepărtează succesiv din lanţul lung de atomi de carbon al acizilor graşi fragmente **Acetil-CoA** cu doi atomi de carbon; aceste fragmente vor fi degradate ulterior pe calea ciclului Krebs.

Procesul de beta-oxidare necesită aport permanent de O_2, concentraţie optimă de AG în interiorul celulei precum şi prezenţa unor coenzime de tipul NAD^+ care pe parcursul reacţiei sunt convertite în forma redusă NADH. Niveluri crescute de coenzimă în formă redusă, precum şi niveluri crescute de acetil-CoA intamitocondrial inhibă beta-oxidarea. De reţinut că AG nu pot produce energie în absenţa oxigenului, spre deosebire de metabolismul glucozei, cel al AG neavând variantă anaerobă.

23.2.2.2 Metabolismul glucozei

Glucoza reprezintă de asemenea un substrat energetic important pentru miocard, mai ales în condiţii de hipoxie. Ea ajunge în sânge prin aport exogen, pătrunderea în celula miocardică făcându-se printr-un mecanism de transport facilitat, activat hormonal.

În celula miocardică, glucoza este fosforilată sub acţiunea **hexokinazei** formându-se **glucoză-6-fosfat** (G-6-P), forma activă biologic a glucozei. Insulina activează hexokinaza, activând prin aceasta indirect pătrunderea glucozei în celulă, în timp ce produsul de reacţie (G-6-P) inhibă hexokinaza.

Metabolismul intracelular al glucozei porneşte de la G-6-P, putând urma 3 căi metabolice:

- degradare parţială pe calea ciclului pentozofosfaţilor, cale puţin activă în miocard în condiţii normale.
- sinteza de glicogen, forma de depozit a glucozei, cale de asemenea puţin activă în mod normal în miocard, unde depozitele de glicogen sunt reduse.
- glicoliza anaerobă, în care G-6-P este degradată printr-o succesiune de reacţii enzimatice până la stadiul de **piruvat**. Reacţiile au loc în totalitate în citoplasmă, soldându-se cu un câştig net de 2 molecule de ATP; ele sunt controlate metabolic, glicoliza anaerobă fiind inhibată de ATP şi creatinfosfat şi stimulată de ADP. Citratul produs pe calea ciclului Krebs inhibă de asemenea glicoliza aerobă prin acţiune asupra unor enzime cheie ale acesteia.

23.2.2.3 Metabolismul lactatului şi piruvatului

Piruvatul este produsul final al glicolizei anaerobe, căile metabolice pe care acesta le va urma depinzând de posibilitatea aportului de O_2:

- în condiţiile **metabolismului aerob**, aşa cum este în mod normal cel miocardic, piruvatul pătrunde în mitocondrie, unde sub acţiunea piruvat-dehidrogenazei este oxidat şi apoi transformat în acetil-CoA care pătrunde în ciclul Krebs. Reacţia este controlată prin feed-back negativ de nivelul acetil-CoA din mitocondrie şi raportul ATP/ADP (ATP-ul inhibă iar ADP-ul stimulează activarea piruvatului).
- în condiţii de **hipoxie** piruvatul este redus, cu formare de lactat, aceasta fiind calea metabolică predominantă în muşchiul scheletic în activitate, acesta având un metabolism predominant anaerob. Caracteristică pentru miocard este posibilitatea de a folosi ca substrat energetic lactatul produs din abundenţă la nivelul musculaturii scheletice. În mod normal 10-30% din lactatul sanguin este extras de miocard, el fiind oxidat intracitoplasmatic în piruvat sub acţiunea lactat-dehidrogenazei (LDH - izoenzima miocardică), piruvatul fiind metabolizat mai departe pe calea ciclului Krebs.

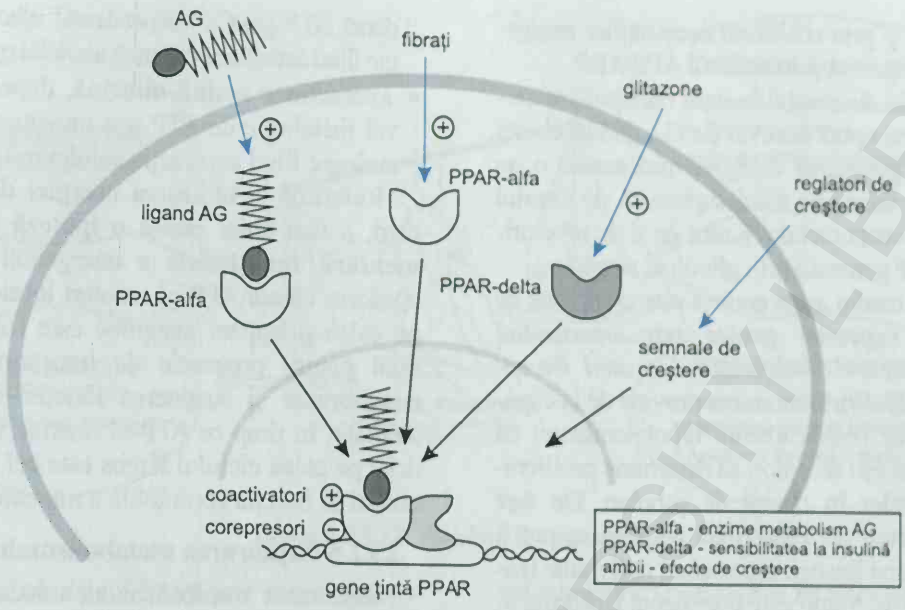


Figura 23.10. Modificarea expersiei genice prin intermediul PPAR în controlul metabolismului. *(explicaţiile în text) (modificat după Opie, 2004)*

23.2.2.4 Metabolismul corpilor cetonici

Corpii cetonici sunt sintetizaţi la nivelul mitocondriilor ficatului, putând fi folosiţi ca sursă energetică de miocard mai ales în condiţii de inaniţie, când glucoza este utilizată preferenţial de ţesuturile dependente de acest substrat energetic (hematie, creier). Prin degradarea corpilor cetonicilor rezultă de asemenea acetil-CoA, care intră în ciclul Krebs.

23.2.2.5 Ciclul Krebs

Ciclul Krebs (glicoliza aerobă) este calea comună de **degradare a Acetil-CoA** care rezultă din diverse metabolisme intermediare. El are loc exclusiv la nivelul mitocondriei, constând într-un ciclu închis de oxidări şi reduceri succesive în care fragmentele Acetil-CoA sunt degradate până la compuşi simpli (CO_2 şi H_2O) cu generarea finală pe calea fosforilării oxidative a 12 molecule de ATP.

Desfăşurarea ciclului Krebs necesită consum de O_2, punctul cheie al controlului acestuia constituindu-l transformarea **citrat→alfa-cetoglutarat**. Reacţia este inhibată de ATP şi stimulată de ADP, generând un mecanism de feed-back negativ care controlează activitatea ciclul Krebs în funcţie nivelul ATP-ului generat. Acumularea de citrat inhibă glicoliza anaerobă, scăzând alimentarea întregului ciclu cu Acetil-CoA pe această cale.

23.2.3 Controlul metabolismului miocardic

Utilizarea optimă de către miocard a substratelor energetice este controlată de mecanisme asigurând integrarea atât la nivelul organismului cât şi la nivelul funcţiei celulare.

La **nivelul organismului** integrarea metabolismului miocardic este **controlată hormonal**, putând fi influenţate:

- disponibilitatea diferitelor substrate plasmatice (AG, glucoză). Nivelul TG plasmatice creşte sub efectul hormonilor care stimulează lipoliza în ţesutul adipos (catecolamine, glucagon, glucocorticoizi) şi scade datorită efectului insulinei, care stimulează lipogeneza; în plus catecolaminele cresc degradarea TG în AG prin stimularea directă a lipoproteinlipazei;
- viteza de intrare a substratelor în celula miocardică, atât indirect prin influenţarea concentraţiilor lor plasmatice şi a utilizării lor de celula miocardică, cât şi direct în cazul existenţei unui mecanism de transfer hormono-sensibil (glucoza);
- degradarea substratelor în celula miocardică, activitatea unor enzime din diferitele căi metabolice fiind hormono-dependentă;
- utilizarea energiei în procese fiziologice miocardice, activitatea pompelor ionice, mecanismele implicate în contracţia miocardică fiind puternic influenţate de diverşi hormoni.

La **nivel celular** se realizează un **control homeostatic**, atât prin efectul de feed-back al unor produşi

de reacție, cât și prin echilibrul necesităților energetice celulare exprimat prin raportul ATP/ADP.

De exemplu, în condițiile unui metabolism cardiac normal, cu aport adecvat de O_2, ponderea cea mai mare în generarea energiei miocardice o au AG, glicoliza anaerobă fiind suprimată de citratul rezultat în secvența ciclului Krebs ca și de nivelurile mari de ATP generate prin glicoliză aerobă.

Pe termen mediu acest control este completat de **modificarea expresiei genice** prin intermediul **PPAR** (*Peroxizome Proliferator-Activated Receptors*) (*Figura 23.10*). Denumirea provine de la capacitatea fibraților (medicamente hipolipemiante) ca prin fixare pe acești receptori să determine proliferarea peroxizomilor în ficatul de șobolan. De fapt PPAR sunt factori de transcripție nucleari ce pot fi activați de diverși liganzi, prezentând mai multe izoforme. La nivelul inimii este prevalenta izoforma α, având rolul major de a produce gene care reglează oxidarea AG. Se crează astfel un model de reglare metacrină: AG cu lanțuri lungi de atomi de carbon funcționează ca liganzi ce activează PPAR-α, care interacționând (dimerizând) cu un alt receptor nuclear, receptorul retinoid (RXR – *Retinoid X Receptor*) activează transcripția genelor țintă. Fiziologic, genele activate sub acțiunea PPAR-α, codifică enzimele implicate în aproape fiecare etapă a utilizării AG, inclusiv β-oxidarea acestora. Supraexpresia PPAR-α crește oxidarea AG și diminuă captarea și utilizarea glucozei ca substrat energetic, de o manieră întâlnită în diabetul zaharat. În miocardul hipertrofiat în schimb se produce o reducere a expresiei PPAR-α, diminuând utilizarea AG ca substrat energetic și favorizând folosirea glucozei, ca și substrat mai economic.

23.2.4 Utilizarea energiei de către miocard

O parte din ATP-ul generat în urma proceselor metabolice celulare este folosit pentru sinteza de **creatinfosfat** prin fosforilarea creatinei sub acțiunea creatinfosfokinazei (CPK) citoplasmatice și mitocondriale. Creatinfosfatul îndeplinește funcție de "tampon" pentru menținerea concentrației ATP în condițiile în care necesarul energetic crește rapid, energia și molecula fosfat din structura sa servind pentru transformarea ADP în ATP.

Cea mai mare parte a ATP-ului este însă folosită la nivel celular ca și furnizor de energie servind pentru:

- sinteză proteică în procesele de reparare și regenerare celulară
- activitatea pompelor ionice, care din punct de vedere metabolic sunt ATP-aze (ATP-aza Na^+-K^+ dependentă, ATP-aza Ca^{2+} dependentă), efectul lor fiziologic fiind activitatea electrică a celulei miocardice
- interacțiune **actină-miozină**, dependentă la nivel metabolic de ATP-aza miozinică, efectul fiziologic fiind contracția celulei miocardice.

Referitor la utilizarea energiei de către miocard, a fost chiar emisă o **ipoteză a compartimentării funcționale** a energeticii miocardice, conform căreia ATP-ul rezultat intracitoplasmatic pe calea glicolizei anaerobe este folosit preferențial pentru procesele de transport ionic transmembranar și susținerea funcției membranelor celulare, în timp ce ATP-ul rezultat intramitocondrial pe calea ciclului Krebs este cel folosit preferențial în funcția contractilă a miocardului.

23.2.5 Explorarea metabolismului miocardic

Explorarea metabolismului miocardic poate fi realizată în condiții clinice cu ajutorul spectroscopiei în rezonanță magnetică nucleară (SRMN), a tomografiei emisive cu pozitroni (PET) sau a scintigrafiei cu trasori emițători de fotoni unici (SPECT).

23.2.5.1 Spectroscopia în RMN

Folosește proprietățile de spin ale nucleilor aflați într-un câmp magnetic putând evalua concentrația unor produși metabolici tisulari și modificările suferite de aceștia în diferite situații experimentale sau clinice.

Principiu fizic. Nucleii unor elemente posedă momente magnetice ce rezultă din mișcarea particulelor subnucleare încărcate în timp ce nucleul se rotește în jurul axei sale. Ca urmare aceștia se comportă ca niște mici magneți, care plasați într-un câmp magnetic uniform se orientează de-a lungul axei acestui câmp, iar la întreruperea câmpului magnetic se reorientează spontan, eliberând energie. Frecvența acestui semnal este diferită în funcție de tipul atomului căruia îi aparține nucleul, iar amplitudinea semnalului pentru fiecare domeniu de frecvență depinde de numărul nucleilor de acel tip. Astfel, analiza matematică a semnalului eliberat după aplicarea câmpului magnetic permite obținerea de informații despre concentrația diferiților produși metabolici miocardici.

Utilizare clinică. Un număr de nuclei ai unor molecule implicate în procese biologice au proprietăți fizice care permit utilizarea lor în tehnicile de SRMN. Cea mai frecvent utilizată substanță este ^{31}P, folosită pentru măsurarea concentrației ATP și produșilor săi de degradare (ADP), a creatinfosfaților sau a fosfaților anorganici. Deși larg aplicată în

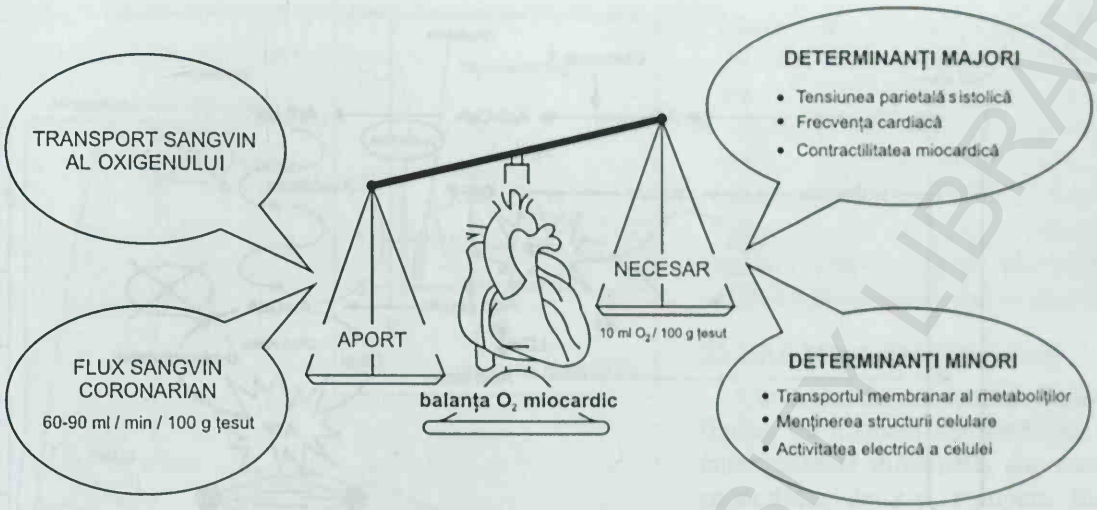


Figura 23.11. Balanța O_2 miocardic.

condiții experimentale, SRMN este abia la începutul utilizării sale clinice, mai ales datorită dificultății de a obține spectre din miocard fără interferențe cu țesuturile din jur, a mișcărilor inimii și mai a ales a lipsei specificității unor modificări metabolice în diferite stări patologice.

23.2.5.2 Tomografia prin emisie de pozitroni

Este o tehnică de imagistică care folosește izotopi emițători de pozitroni încorporați în diverși compuși organici, imaginea fiind creată în corelație cu numărul de pozitroni emiși din zona respectivă a miocardului, permițând estimarea preluării acestor compuși de țesutul miocardic.

Principiu fizic. Pozitronii sunt particule cu masa egală cu a electronului, dar cu sarcină pozitivă, care eliberați din nucleu interacționază cu electroni orbitali pierzându-si energia cinetică și dând naștere la o pereche de fotoni, emiși în direcții diametral opuse, putând fi detectați de un sistem adecvat. Se poate localiza astfel distribuția substanțelor marcate cu izotopi emițători de protoni la nivelul miocardului.

Utilizare clinică. Perfuzia miocardică poate fi studiată folosind **NH_3 marcat cu ^{13}N**, în timp ce studiul captării **glucozei marcate cu ^{18}F** sau a **acidului palmitic marcat cu ^{14}C** sunt folosite pentru definirea sursei energetice preferențiale a miocardului.

23.2.5.3 Scintigrafia cu trasori emițători de fotoni unici

Deoarece miocardul extrage preferențial AG cu lanțuri lungi de atomi de carbon, marcarea acestora cu trasori radioactivi permite studiul repartizării acestora în miocard și a curbei lor de clearance. Pentru studiul metabolismului miocardic cu ajutorul tehnicilor scintigrafice se folosesc **AG marcați cu ^{123}I**, care injectați intravenos se acumulează rapid la nivelul miocardului, curba de clearance evoluând bifazic, cu o fază rapidă ce corespunde β-oxidării AG și una lentă corespunzătoare preluării acestora de rezervorul lipidic endogen.

23.2.5.4 Ischemia miocardică

Ischemia miocardică *(gr. Ischo = prea puțin, haima = sânge)* desemnează un flux sanguin coronarian insuficient față de necesitățile metabolice ale miocardului la un moment dat. Principala consecință a ischemiei este **hipoxia**, adică un aport insuficient de O_2, care însă poate apare și în alte situații (de exemplu anemia, sau afecțiuni respiratorii). Spre deosebire însă de ischemie, în hipoxie fără alterarea fluxului coronarian, posibilitatea de „spălare" a metaboliților acumulați la nivel miocardic este păstrată.

Esența ischemiei miocardice o constituie alterarea balanței dintre necesarul și aportul miocardic de O_2 (*Figura 23.11*).

Necesarul miocardic de O_2 este estimat a fi de aproximativ **10 ml O_2/100 g țesut/minut**. La o greutate a inimii de aproximativ 250-300 g, necesarul de O_2 al cordului întreg este de 25-30 ml de O_2/minut. O serie de factori ținând de gradul de activitate a inimii pot modifica însă semnificativ acest necesar.

Aportul miocardic de O_2 este realizat de circulația coronariană, fiind egal cu produsul dintre fluxul sanguin coronarian și coeficientul de extracție al O_2 din sângele coronarian. Așa cum s-a menționat, datorită metabolismului miocardic preferențial aerob, miocardul realizează în condiții bazale o extracție maximă a O_2 din sângele arterial, coeficientul de extracție fiind de aproximativ

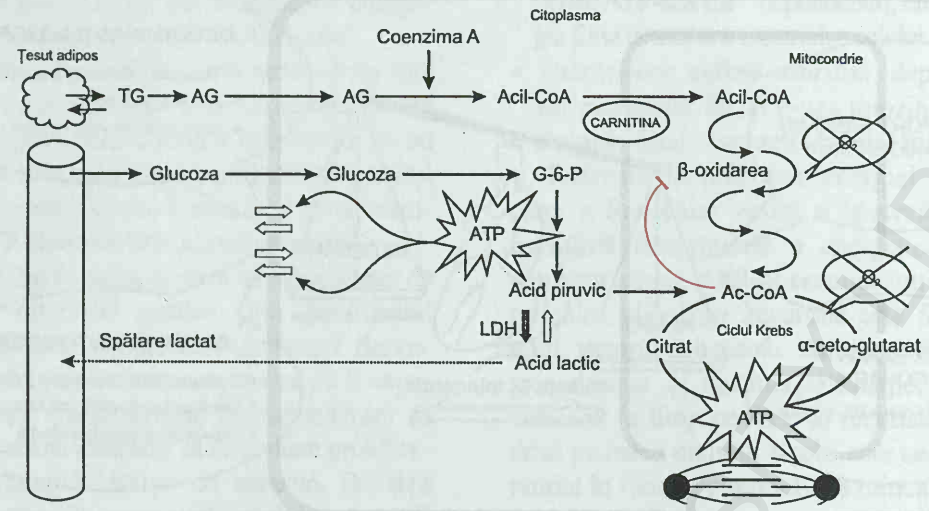


Figura 23.12. Prezentarea schematică a principalelor căi metabolice funcționale la nivelul celulei miocardice în ischemia ușoară-moderată *(explicațiile în text)*

70-75% (12 ml O_2 /100 ml sânge). În condițiile creşterii necesarului miocardic de O_2, această extracție nu mai poate fi crescută, astfel încât adaptarea se realizează în această situație în exclusivitate prin modificarea fluxului sanguin coronarian.

Fluxul sanguin coronarian reprezintă aproximativ 4-5% din debitul cardiac, fiind în jur de 300 ml/minut sau **60-90 ml/minut/ 100 g de țesut**. Aceste valori pot creşte de 4-5 ori în condiții de efort, ceea ce arată că fluxul sanguin miocardic la inima normală cu coronare intacte nu constituie factorul limitativ al metabolismului miocardic. În cazul reducerii activității mecanice şi a necesităților metabolice, viabilitatea miocardului poate fi menținută şi la un flux de 10-20 ml/min sau chiar în absența fluxului pentru o perioadă de până la 100 min, aşa cum se întâmplă în timpul hipotermiei, practicată pentru intervențiile chirurgicale pe cord.

Modificările metabolismului miocardic în ischemie sunt variabile în funcție de gradul acesteia.

Ischemia ușoară-medie

Este caracterizată metabolic prin accentuarea glicolizei anaerobe în detrimentul utilizării AG ca şi substrat energetic.

Mecanismele de reglare metabolică prin care se realizează aceasta pornesc de la încetinirea ciclului Krebs datorită hipoxiei, scăzând astfel producția de ATP şi citrat, cu acumularea de acetil-CoA; acesta suprimă β-oxidarea AG, cale metabolică care consumă cantități importante de O_2.

Scăderea producției de ATP şi citrat înlătură inhibiția pe care aceşti compuşi o realizau asupra glicolizei anaerobe, această cale metabolică fiind activată. Funcționarea insuficientă a ciclului Krebs produce acumulare de lactați alături de alți metaboliți acizi, care însă mai pot fi "spălați" de circulația coronariană încă existentă.

Ca urmare, în ischemia ușoară glicoliza anaerobă produce mici cantități de ATP folosite preferențial pentru susținerea funcției membranei celulare şi cu conservarea viabilității celulei, în timp ce reducerea oxidării mitocondriale determină scăderea funcției contractile, conservând energetica celulară (*Figura 23.12*).

Ischemia severă

Se caracterizează din punct de vedere metabolic prin suprimarea glicolizei.

Momentul tranziției de la ischemia medie la cea severă ține de posibilitatea "spălării" metaboliților acizi de circulația coronariană încă existentă. Atunci când aceşti metaboliți nu mai pot fi înlăturați, acumularea acestora duce la scăderea pH-ului, cu inhibiția completă a glicolizei, care reduce drastic nivelul de ATP. Imposibilitatea menținerii activității pompelor ionice duce la alterarea severă a fenomenelor electrice celulare, cu acumulare intracelulară de Ca^{2+} şi moarte celulară.

Pierderea integrității membranei celulare duce la eliberarea în plasmă a unor constituienți celulari (troponina T) sau enzime intracelulare (lactatdehidrogenaza, creatinkinaza), dozarea concentrației, respectiv activității acestora fiind folosită ca un indicator al severității leziunilor ischemice (*Figura 23.13*).

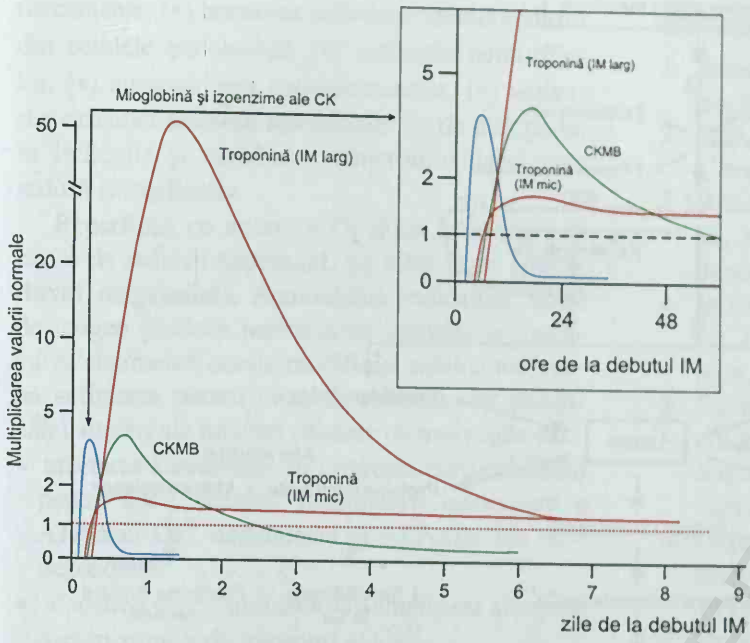


Figura 23.13. Dinamica concentraţiei plasmatice pentru principalele enzime de citoliză miocardică folosite pentru diagnosticul şi urmărirea evoluţiei în infarctul miocardic acut

Cunoaşterea modificărilor biochimice care au loc în ischemia miocardică a permis conceperea de terapii care să acţioneze la acest nivel, dintre care se pot menţiona:

- administrarea de soluţii "repolarizante" conţinând glucoză şi insulină, cu scopul de a furniza miocardului substratul pentru glicoliza anaerobă, favorizând totodată captarea acestuia în celulă şi utilizarea lui pe această cale metabolică;
- folosirea trimetazidinei sau ranolazinei, un compuşi care acţionând la nivel enzimatic asupra 3-cetoacil CoA tiolazei inhibă β-oxidarea AG, favorizând obţinerea energiei pe calea mai economică a glicolizei anaerobe;
- administarea de coenzimă Q, care stabilizează membranele celulare mediind transferul de electroni la nivel citocromic.

Deşi atractive din punct de vedere conceptual, beneficiile reale ale unor asemenea terapii în practică trebuie încă evaluate.

23.2.5.5 Miocardul hibernant

Conceptul de miocard hibernant defineşte un miocard hipoperfuzat, cu o contractilitate diminuată, dar care are capacitatea de a-şi recupera funcţia contractilă în condiţiile restabilirii fluxului coronarian.

Din punct de vedere metabolic, miocardul hibernant este caracterizat prin suprimarea β-oxidării AG, cu menţinerea însă funcţională a glicolizei anaerobe, care asigură aportul energetic minimal pentru păstrarea integrităţii membranelor celulare.

Evidenţierea miocardului hibernant reprezintă un deziderat important în era tehnicilor de revascularizaţie miocardică, el fiind una din ţintele terapeutice cărora li se adresează aceste proceduri. Există mai multe metode de investigaţie care permit punerea în evidenţă a miocardului hibernant:

- **ecocardiografia cu dobutamină** permite evidenţierea unor zone hipokinetice, care îşi ameliorează contractilitatea după dobutamină, reprezentând plauzibil miocard hibernant
- **scintigrafia miocardică**, cu ^{201}Th sau ^{99}Tc (preparatul comercial care este injectat cuprinde izo-

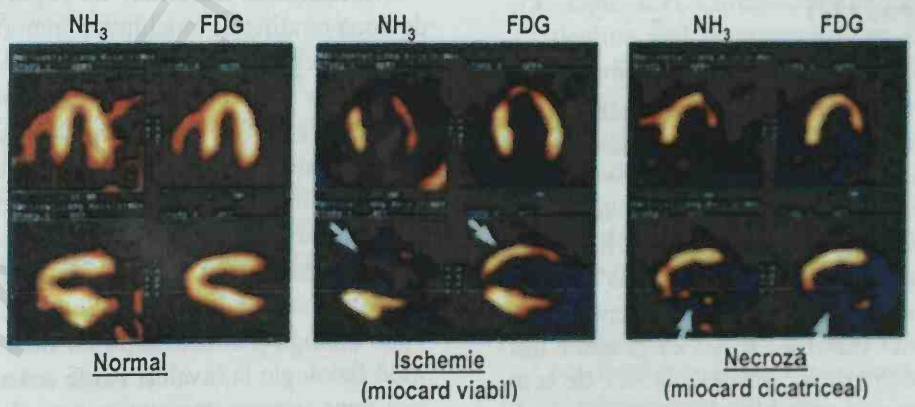


Figura 23.14. Evaluarea viabilităţii miocardice prin tehnica PET.

În cazul miocardului ischemic acesta are un flux coronarian scăzut, captând deficitar $^{13}NH_3$, dar îşi păstrează capacitatea de a metaboliza glucoza, captând fluordeoxiglucoza (FDG). În cazul miocardului necrotic alterarea fluxului coronarian este însoţită de suprimarea metabolismului glucidic *(după Braunwald, 2004).*

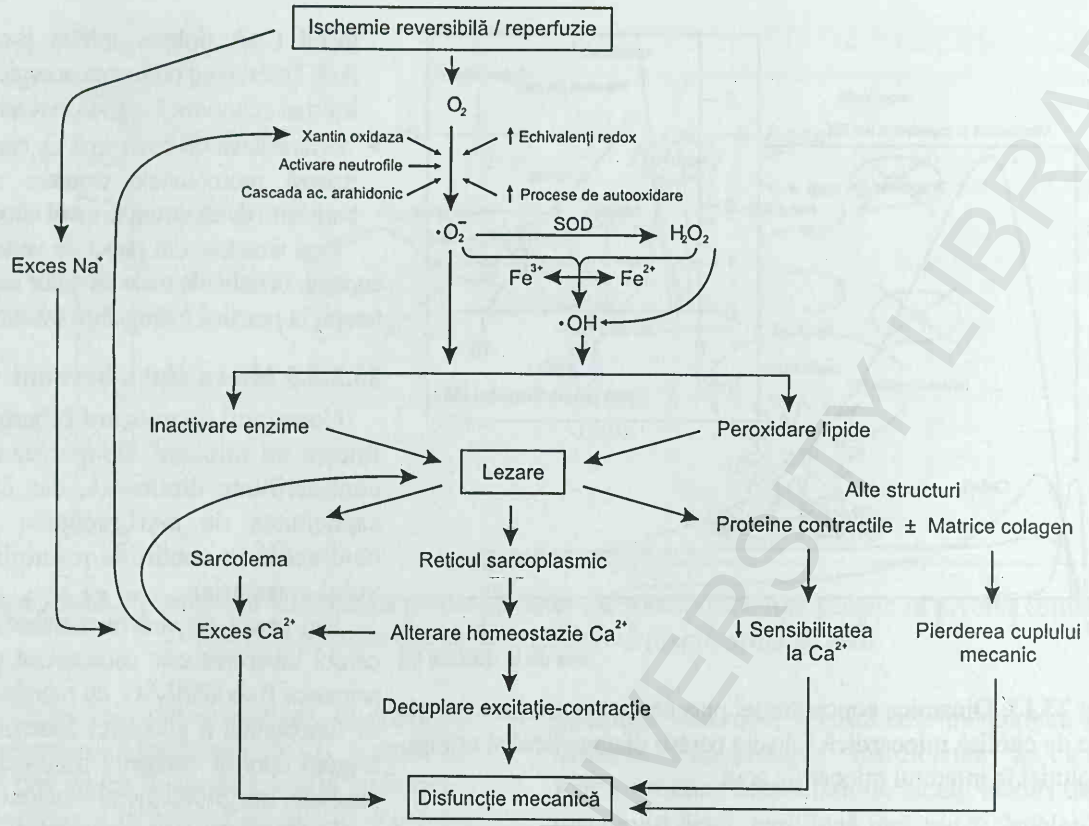


Figura 23.15. Mecanismele implicate în apariţia leziunilor miocardice de reperfuzie *(după Boli, 1990).*

topul fixat complexat cu 6 molecule de ligand methoxyisobutylisonitrile –SESTA MIBI) permite evidenţierea zonelor care fixează tardiv izotopul, spre deosebire de captarea normală sau de miocardul necrotic care nu-l fixează deloc.

- **tomografia prin emisie de pozitroni** (PET) este tehnica de elecţie pentru evidenţierea miocardului hibernant corespunzător zonelor care captează mai puternic glucoza (marcată cu ^{18}F), comparativ cu fluxul coronarian estimat cu $^{13}NH_3$ (*Figura 23.14*).

23.2.5.6 Precondiţionarea miocardică

Constă în creşterea toleranţei la ischemie a miocardului care a suferit anterior episoade de ischemie tranzitorie.

Mecanismul acestui fenomen este incomplet precizat, unul din mediatorii implicaţi fiind **adenozina** produsă în timpul episoadelor de ischemie tranzitorie. Acţionând asupra unor receptori miocardici specifici (tipul A_1 şi A_3) ea produce deschiderea canalelor de K^+ sensibile la ATP de la nivelul sarcolemei şi membranei mitocondriale, limitând acumularea Ca^{2+} cu efect nociv, dar şi sinteză de proteine intracelulare, probabil implicate în precondiţionarea pe termen lung a miocardului.

23.2.5.7 Reperfuzia miocardică

Datorită dezvoltării tehnicilor de revascularizaţie coronariană (medicamentoasă, intervenţională sau chirurgicală), în ultimii ani se acordă o importanţă tot mai mare modificărilor care apar la nivelul miocardului ischemic după restabilirea fluxului coronarian, constatându-se că reperfuzia miocardică poate să inducă leziuni de severitate variabilă, mergând până la moartea celulară.

Mecanismul leziunilor de reperfuzie cuprinde două modificări biochimice importante, care se întreţin reciproc, formând un adevărat cerc vicios: **generarea în exces de radicali liberi de O_2** şi **acumulare de Ca^{2+} intracelular** (*Figura 23.15*).

Radicalii liberi de oxigen sunt prezenţi în mod fiziologic în celulă, cel mai important fiind **anionul superoxid**, un atom de oxigen având un electron suplimentar pe ultimul orbital. El reprezintă forma activă a O_2, sub care acesta intră în toate reacţiile biologice, concentraţia lui fiind menţinută în mod fiziologic la niveluri foarte scăzute sub acţiunea unor sisteme enzimatice care îl neutralizează (de exemplu citocromoxidaza mitocondrială).

În ischemie este stimulată formarea de anion superoxid din O_2 rămas disponibil, prin mai multe

mecanisme: (•) creşterea activităţii xantinoxidazei din celulele endoteliale, (•) activarea neutrofilelor, (•) autooxidarea catecolaminelor, (•) activarea cascadei acidului arahidonic. Pe de altă parte, în ischemie şi activitatea citocromoxidazei este redusă semnificativ.

Reperfuzia cu aport de O_2 duce la formare în exces de radicali superoxid, cu efect toxic (**paradoxul oxigenului**). Acumularea radicalilor liberi de oxigen produce peroxidarea lipidelor şi inactivarea enzimelor, aceste modificări nefiind totdeauna suficiente pentru moartea celulară, dar producând alterări ale funcţiei celulare pe mai multe căi:

- afectarea sarcolemei cu creşterea permeabilităţii pentru Ca^{2+}, datorită funcţionării inadecvate a ATP-azei Ca^{2+}-dependente şi ATP-azei Na^{+}-K^{+}-dependente
- afectarea reticulului sarcoplasmatic cu alterarea mecanismului de transport al Ca^{2+}.

Ambele mecanisme duc la **supraîncărcarea celulară cu Ca^{2+}** care agravează suplimentar leziunile:

- creşterea Ca^{2+} intracelular activează fosfolipazele care accentuează alterarea celulară iniţiată de anioni superoxid
- acumularea intramitocondrială a Ca^{2+} scade suplimentar activitatea citocrom-oxidazei.
- alterarea homeostaziei Ca^{2+} determină funcţionarea anormală a cuplului electro-contractil
- excesul de Ca^{2+} determină afectarea proteinelor contractile cu scăderea afinităţii acestora pentru Ca^{2+} şi scăderea contractilităţii.

Expresia clinică a leziunilor de reperfuzie include:

- **aritmiile de reperfuzie**, având un mecansim specific, acela al postdepolarizărilor precoce, legat de supraîncărcarea celulară cu Ca^{2+};
- **stunningul miocardic** este o disfuncţie contractilă reversibilă, care apare după restaurarea completă a fluxului sanguin legată de mecanismele biochimice descrise anterior;
- **moartea celulară**, fiind demonstrat că datorită mecanismelor lezionale menţionate, se poate produce necroza unor celule viabile anterior reperfuziei.

Bibliografie selectivă

1. Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M. and Stanton, B.A. *Physiology*, Mosby-St.Louis, 5th Ed, 2004.
2. Boli, R. Mechanism of myocardial stunning. *Circulation* 82:723-735, 1990.
3. Braunwald, E., Libby, P., Bonow, R. Mann, D., Zipes, D. and *Heart Disease*, W.B.Saunders-Philadelphia, 8th Ed, 2008.
4. Bullock, J., Boyle, J. and Wang, M. *Physiology*, Lippincott Williams & Wilkins-Philadelphia, 1994. 2nd Ed.
5. De Silva, R. and Camici, P. Role of positron emission tomography in the investigation of human coronary circulatory function. *Cardiovascular Research* 1994, 28:1595-1612.
6. Depre, C., Vanoverschelde, J.L. and Taegtmeyer, H. Glucose for the heart. *Circulation*, 1999, 99:578-588.
7. Dobreanu, D. *Fiziologia inimii*, University Press-Targu Mures, 2007.
8. Ferrari, R. Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol*, 1995, 76:17B-24B.
9. Katz, A.M. *Physiology of the Heart*, Lippincott Williams & Wilkins-Philadelphia, 3rdEd., 2001.
10. Kloner, R.A., Boli, R., Marban, E. and Reinlib, L. Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. *Circulation*, 1998, 97:1848-1867.
11. Knight, C. and Fox, K. From antianginal drugs to myocardial cytoprotective agents. *Am J Cardiol*, 1995, 76:4B-7B.
12. Opie, L.H. Cardiac metabolism - emergence, decline and resurgence (Part I). *Cardiovascular Research*, 1992, 26:721-733.
13. Opie, L.H. Cardiac metabolism - emergence, decline and resurgence (Part II). *Cardiovascular Research*, 1992, 26:817-830.
14. Opie, L.H. *Heart Physiology - From Cell to Circulation*, Lippincott Williams & Wilkins-Philadelphia, 4th Ed, 2004.
15. Rahimtoola, S. The hibernating myocardium. *Am Heart J*, 1989, 117:211-221.
16. Sabău, M. *Fiziologia inimii*, University Press-Targu Mures, 1999.
17. Walker, D.M. and Yellon, D.M. Ischaemic preconditioning: from mechanisms exploitation. *Cardiovascular Research*, 1992, 26:734-739.
18. Yellon, D. The current status of stunning, hibernation and preconditioning. *Cardiovascular Research*, 1993, 27:886-890.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anexa 1. Abrevieri

17-CS = 17 cetosteroizi
2,3-DPG = 2,3-difosfoglicerat
5 HTA = Serotonina = 5 hidroxi-triptamina
5-HIAA = acid 5-hidroxi indolacetic
α1 AT = alfa 1 antitripsina
α2 Mg = alfa 2 macroglobulina
Aa = aminoacizi
AC = anhidraza carbonică
Ac ~ S CoA = acetil coenzima A
ACE = *angiotensin converting enzyme* – enzima de conversie a AT I în AT II
ACP = proteina de transport / transfer a grupărilor acil
ACTH = hormon adrenocorticotrop
ADA = *American Diabetes Association*
ADAMTS-13 = *a disintegrin – like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13*
ADH = *antidiuretic hormone* – vasopresina
ADN = acid dezoxiribonucleic
ADNdc = ADN dublu catenar
ADNmc = ADN monocatenar
ADNmt = ADN mitocondrial
ADP = adenozin difosfat
AFP = alfa fetoproteina
AG = acizi graşi
AINS = antinflamatoare nonsteroidiene
ALA = acid δ-amino levulinic
Ala = alanina
ALAD = acid δ-amino levulinic dehidratază
ALT = GPT = alanin transaminaza, glutamico-piruvico transaminaza
AMP = adenozin monofosfat
AMPc = Adenozinmonofosfat ciclic
ANP = *atrial natriuretic peptide* – peptidul natriuretic atrial
APC = proteina C activată
ApoP = apoproteine
APTT = timpul de tromboplastină parţial activată
APUD = *amine precursor uptake and decarboxylation*
Arg = arginina
ARN = acid ribonucleic
ARNm = ARN mesager
ARNr = ARN ribozomal
ARNt = ARN de transfer
AST = GOT = aspartat transaminaza, glutamico-oxalacetico transaminaza
AT = angiotensină
AT III = antitrombina III
ATP = adenozin trifosfat
AVK. = antivitamine K
AVM = acid vanilmandelic
β TG = β tromboglobulina
β2 mg = beta-2-microglobulina
BA = bicarbonat actual
Bar; 1 bar = 0,1 MPa = 100 kPa = 10^5 Pa
BE = baze exces
βHCG = fracţiunea β a hormonului coriogonadotropic uman
BHE = bariera hemato-encefalică
Bi = bilirubină
BK = bradikinină
BS = bicarbonat standard
BT = baze tampon
C = *clearance*
C4b-BP = *C4b Binding Protein* – proteina care leagă fracţiunea C4b a complementului
Ca = calciu total
Ca^{2+} = calciu ionic
CCK = colecistokinina
CDC = *Centers for Disease Control and Prevention* (Atlanta)
CEA = antigenul carcinoembrionar
Ch = chilomicroni
CIC = complexe imune circulante
CID = coagulare intravasculară diseminată
Cit = citocrom
CK = CPK = creatinfosfat kinază

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cl = clor
CLIP = *corticotropin-like intermediary peptide* – peptidul similar corticotropinei, provenit din lobul intermediar
CMH = complex major de histocompatibilitate
CMP = citidin monofosfat
CO_2 = dioxid de carbon
CRH = *corticotropin releasing hormone* – corticoliberină
CSR = corticosuprarenala
Cu = cupru
D-D = D-dimeri
DAG = diacilglicerol
dAMP = deoxiadenozin monofosfat
dCMP = deoxicitidin monofosfat
DDAVP = Dezaminodextroargininvasopresină
dGMP = deoxiguanozin monofosfat
DI = diabet insipid
DIT = diiodtirozină
DOPA = dihidroxi fenil alanina
dTMP = deoxitimidin monofosfat
DXA = DEXA = dual energy X-ray absorptiometry
DZ = diabet zaharat
EAB = echilibrul acido-bazic
EDRF = *endothelial derived relaxing factor*
EDTA = etilen diamino tetra acetat
EGF = *epidermal growth factor*
EIA = *enzymatic imunoassay*
ELAM = *endothelial leucocyte adhesion molecule*
ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*
EPCR = *endothelial protein C receptor* – receptorul endotelial al proteinei C
EPI = *external pathway inhibitor* - inhibitorul căii extrinseci
EXCA = *extrinsic coagulation activity assay*
F Alc = FAL = fosfatază alcalină
FAH = fenilalanin hidroxilază
FDA = Food and Drug Administration
FeOOH = oxihidroxid feric
FGF 1-7 = factori de creştere ai fibroblaştilor 1-7
FIA = *fluorescent imunoassay*
FIPA = *fibrinolysis parameters assay*
FN = fibronectina
FPR = fluxul plasmatic renal
FSH = hormonul foliculostimulator
FSR = fluxul sanguin renal
G = glucoză
GGT = γGT = γ glutamil transpeptidază
GH = hormonul de creştere
GH-R = receptorului pentru GH
GHBP = *GH-binding proteins* – proteine care leagă GH
GHRH = *growth hormone releasing hormone* - somatoliberină
GHRP = *growth hormone releasing peptides* – peptide care determină eliberarea GH
GIP = *gastric inhibitory polypeptide* – polipetidul inhibitor gastric
Gln = glutamină
Glu = acid glutamic
GLUT = transportor de glucoză
GM = greutate moleculară
GMP = guanozin monofosfat
Gn = glicogen
GN = glomerulonefrită
H_2 = hidrogen gazos
H_2CO_3= acid carbonic
Hb = hemoglobină
HbA1c = hemoglobină glicozilată, fracţiunea 1c
HbF = hemoglobina fetală
HC II = cofactorul II al heparinei
hCG -= *human chorionic gonadotropin* - gonadotropina corionică umană
HCG = hCG = hormon coriogonadotropic uman
HCl = acid clorhidric
HCO_3 = bicarbonat
HDL = *high density lipoproteins* – LP cu densitate mare
HER-2 = receptorul pentru factorul de creştere epidermic
His = histidină
HIV = virusul imunodeficienţei umane
HLA -A, -B, -C = antigene leucocitare umane A, B, C
HMWK = *high molecular weight kininogen* – kininogen cu masă moleculară mare
HPL = *human placental lactogen*
HPLC = cromatografia lichidă de înaltă presiune/ performanţă
HSP = Hsp = *heat-shock proteins* – proteine de şoc termic
HVA = Acid Homovanilinic
i.m. = intramuscular
i.v. = intravenos
IDDM = diabet zaharat insulino-dependent
IFN-γ = interferon γ
Ig G, A, M = imunoglobuline G, A, M
IGF = *insulin-like growth factors* – factor de creştere asemănător insulinei
IL = interleukină
IL-1 = interleukina 1
IL-6 = interleukina 6
INR = *international normalized ratio*

BUCUR CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IP_3 = inozitol 1,4,5 - trifosfat
IRA = insuficienţă renală acută
IRC = insuficienţă renală cronică
ISI = *international sensitivity index*
JAK2 = *Janus kinase 2*
K = potasiu = kaliu
K= constanta de echilibru
LA = lacună anionică
LCAT = lecitin colesterol acil transferază
LCR = lichid cefalorahidian
LDH = lactat dehidrogenaza
LDL = *low density lipoproteins* – LP cu densitate mică
LEC = lichid extracelular = ECF (*extracelular fluid*)
LED = lupus eritematos diseminat
LH = hormonul luteinizant
LIA = *luminescent imunoassay*
LIC = lichid intracelular
LLA = leucemie limfatică acută
LLC = leucemie limfatică cronică
LP = lipoproteine
LPH = lipotropina
LPL = lipoprotein lipază
LTP = CETP = proteina de transfer a lipidelor între LP
Lys = lizina
MAO = monoaminoxidaza
MAPK = *mitogen-activated protein kinase* - proteinkinazele activate de mitogeni
Mb = mioglobină
MBG = membrana bazală glomerulară
MCF = microscopie în contrast de fază
MCH = media hemoglobinei corpusculare
MCV = volumul mediu eritrocitar
MEN = Neoplaziile endocrine multiple
Mg = magneziu
Mg^{2+} = magneziu ionic
MGG = May-Grünwald-Giemsa
MIT = monoiodtirozină
MLP = microscopie în lumină polarizată
MO = microscopie optică
MSH = hormonul melanocitostimulator
Na = sodiu = natriu
NANA = acid N-acetil neuraminic
NH_3 = amoniac
NH_4^+ = ion amoniu
NH_4OH = hidroxid de amoniu
NIDDM = diabet zaharat noninsulinodependent
NIS = *natrium-iodide symporter* – sistem de sinport Na^+/I^-
NO = oxidul nitric = EDRF = *Endotelium-Derived Relaxing Factor*
NSE = enolaza neuron specifică
OMS = Organizaţia Mondială a Sănătăţii
PABA = acid para-aminobenzoic
PAF = *platelet activating factor* – factorul activator plachetar
PAH = acid p-amino hipuric
PAI = *plasminogen activator inhibitor* – inhibitorul activatorului plasminogenului
PAR-1 = receptor activat de proteaze 1
PBG = porfobilinogen
PC = prohormon convertază
PC = proteina C
pCO_2 = presiunea parţială a dioxidului de carbon
PCR = proteina C reactivă
PDF = produşi de degradare ai fibrinei şi fibrinogenului
PDGF = *platelet derived growth factor* – factorul de creştere endotelial derivat din plachete
PEF = presiune efectivă de filtrare
PET = tomografie de emisie cu pozitroni
PF3 = *platelet factor 3* – factorul plachetar 3
PF4 = *platelet factor 4* – factorul plachetar 4
PGI_2 = prostaglandina I_2 = prostaciclina
pH = lg $1/[H^+]$
Phe = fenilalanină
pHi = pH izoelectric
Pi = fosfaţi anorganici
PIP_2 = fosfatidilinozitol 4,5-difosfat
PIVKA = *protein induced by vitamin K absence or antagonism* – proteine induse în absenţa sau antagonizarea vitaminei K
PKC = proteinkinaza C
PLC = fosfolipaza C
PMN = polimorfonucleare neutrofile
pO_2 = presiunea parţială a oxigenului
POMC = proopiomelanocortina
PPP = *platelet poor plasma* – plasmă săracă în plachete
PRL = prolactina
PRP = *platelet rich plasma* – plasmă bogată în plachete
PS = proteina S
PSA = antigen specific prostatic
PT = timp de protrombină
PTH = parathormonul
PTH rP = peptid similar hormonului paratiroidian
PZ = proteina Z
PZI = *protein Z inhibitor* – inhibitorul proteinei Z
RAA = renină – angiotensină – aldosteron
RBF = *renal blood flow* – fluxul sanguin renal

RBP = *retinal,-ol binding protein* – proteina transportatoare de retinal, -ol
RFG = rata filtrării glomerulare
RFGe= rata filtrării glomerulare estimate pe baza formulei Cockcroft-Gault
RIA = metode de radioimunochimie
SBG = stercobilinogen
sc-t-PA = *single chain t-PA*
sc-u-PA = prourokinaza
SCC = antigenul celulelor carcinomatoase scuamoase
Ser = serină
SIADH = *Syndrome of Inapropiate production of ADH* – sindrom de producere inadecvată a ADH
SIDA = sindromul de imunodeficiență dobândită
SNC = sistem nervos central
SPECT = scintigrafie cu trasori emițători de fotoni unici
SRE = sistemul reticulo-endotelial
SRMN = spectroscopia în rezonanță magnetică nucleară
STAT = *signal transducers and activators of transcription* - molecule de traducere a semnalului și activare a transcripției
STH = hormonul de creștere (somatotrop)
t-PA = *tissue plasminogen activator* – activator tisular al plasminogenului
T3 = triiodtironina; fT3 = triiodtironina liberă; TT3 = triiodtironina totală
T4 = tiroxina; fT4 = tiroxina liberă; TT4 = tiroxina totală
TAFI = *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* – inhibitorul fibrinolizei activat de trombină
TBG = *thyroxine binding globulin* – globulina care leagă tiroxina
TBPA = *thyroxine binding prealbumin* – prealbumina care leagă tiroxina
tc-t-PA = two chain t-PA
TCD = tub contort distal
TCP = tub contort proximal
TF = factor tisular
TF = *tissue factor* – factorul tisular
TFPI = *tissue factor pathway inhibitor* – inhibitorul căii mediate de factorul tisular
TG = trigliceride
TGF α, β = *transforming growth factors α, β* – factorul de creștere transformant α și β
THBR = *thyroid hormones binding ratio* - raportul de legare a hormonilor tiroidieni
TIBC = capacitatea totală de legare a fierului
TIMP = inhibitorul tisular al metaloproteinazelor
TK = timidin-kinaza
TM = trombomodulina
Tn = troponină
TNFα = factor de necroză tumorală α
tPA = activatorul tisular al plasminogenului
TPA = *tissue polypeptide antigen* - antigenul polipeptidic tisular
TQ = timp Quick
TRAb = anticorpi anti-receptor de TSH
TRE = *thyroid response elements* – elemente de răspuns la hormonii tiroidieni
TRH = *thyrothropin-releasing hormone* – tireoliberina
Trp = triptofan
TSH = hormonul tireostimulant
TSH = *thyroid-stimulating hormone* – hormonul tireotrop
TT = timp de trombină
TTR = *transthyretin* – transtiretina
TxA_2 = tromboxanul A_2
u-PA = urokinaza
Ubg = UBG = urobilinogen
UDP = uridin difosfat
UMP = uridin monofosfat
UTP = uridin trifosfat
Val = valină
VCAM = *vascular cells adhesion molecule*
VGEF = *vascular endothelia growth factor* – factorul de creștere al endoteliilor vasculare
VIP = *vasoactive intestinal polypeptide* – polipeptidul vasoactiv intestinal
VLDL = *very low density lipoproteins* – LP cu densitate foarte mică
VPF = factorul permeabilizator vascular
VSH = viteza de sedimentare a hematiilor
vWF = *von Willebrand factor* – factorul von Willebrand
Zn = zinc

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Anexa 2.
O CRONOLOGIE A BIOCHIMIEI

• 1770-1774 ***Priestley*** a descoperit O_2 şi a arătat că este produs de plante şi consumat de animale

• 1773 ***Rouelle*** a izolat ureea din urină (primul compus organic izolat)

• 1804 ***Dalton*** a enunţat teoria atomică

• 1806 ***Vauquelin şi Robiquet*** au izolat primul aminoacid (Asparagina)

• 1810 ***Gay - Lussac*** a dedus ecuaţia fermentaţiei alcoolice

• 1837 ***Berzelius*** a postulat natura catalitică a fermentaţiei şi apoi a identificat acidul lactic ca un produs al activităţii musculare

• 1838 ***Schleiden şi Schwann*** au enunţat teoria celulară

• 1838 ***Mulder*** a realizat primele studii sistematice asupra proteinelor

• 1842 ***Mayer*** a enunţat prima lege a termodinamicii şi a arătat aplicabilitatea ei la organismele vii

• 1850 - 1855 ***Bernard*** a izolat glicogenul din ficat, demonstrând că acesta este transformat în glucoza din sânge; a descoperit gluconeogeneza

• 1857 ***Kölliker*** a descoperit mitocondriile în muşchi

• 1859 ***Darwin*** a publicat **"Originea speciilor"**

• 1864 ***Hoppe - Seyler*** a fost primul care a obţinut o proteină (Hemoglobina) în stare cristalină

• 1866 ***Mendel*** şi-a publicat experienţele care l-au condus la enunţarea principiilor segregării genelor

• 1869 ***Miescher*** a descoperit ADN-ul

• 1893 ***Ostwald*** a dovedit că enzimele sunt catalizatori

• 1897 -1906 ***Eijkman*** a arătat că beri - beri este o maladie produsă de lipsa unui component în dietă, care se găseşte în cortexul boabelor de cereale

• 1902 ***Fischer şi Hofmeister*** au demonstrat că proteinele sunt polipeptide

• 1905 ***Knoop*** a descoperit β oxidarea acizilor graşi

• 1907 ***Fletcher şi Hopkins*** au arătat că acidul lactic este produs în muşchi din glucoză, în timpul contracţiei anaerobe

• 1909 ***Sörensen*** a arătat efectul pH-ului asupra activităţii enzimatice

• 1912 ***Warburg*** a arătat necesitatea fierului pentru respiraţie, a postulat existenţa unei enzime respiratorii necesară activării oxigenului, inhibată de cianură

• 1913 ***Michaelis şi Menten*** au dezvoltat o teorie cinetică a acţiunii enzimelor

• 1925 - 1930 ***Levene*** a elucidat structura mononucleotidelor şi a arăta că sunt unităţi constitutive ale acizilor nucleici

• 1925 - 1930 ***Svedberg*** a inventat ultracentrifuga

• 1928 ***Euler*** a izolat carotenul

• 1928 - 1932 ***Szent - Györgyi*** a izolat acidul ascorbic

• 1929 ***Fiske şi Subbarow*** au izolat ATP şi fosfocreatina din extracte de muşchi

• 1930 ***Karl Landsteiner*** premiul Nobel pentru descoperirea grupelor sasnguine

• 1933 ***Krebs şi Henseleit*** au descoperit ciclul ureei

• 1933 ***Embden şi Meyerhof*** au demonstrat intermediarii cruciali în calea glicolitică

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" IAŞI LIBRARY

• 1935 ***Schoenheimer şi Rittenberg*** au folosit pentru prima dată izotopii radioactivi ca trasori în studiul metabolismului intermediar al hidraţilor de carbon şi lipidelor

• 1935 ***Davson şi Danielli*** au postulat un model pentru structura membranelor celulare

• 1937 ***Krebs*** a postulat ciclul acidului citric

• 1939 - 1941 ***Lipmann*** a postulat rolul central al ATP în transferul de energie

• 1939 - 1946 ***Szent - Győrgyi*** a descoperit actina şi actomiozina

• 1943 ***Ochoa*** a demonstrat că raportul **P : O** al fosforilării oxidative pentru ciclul acizilor tricarboxilici, este 3

• 1943 ***Henrik Dam şi Edward Adelbert Doisy*** - premiul Nobel pentru decoperirea vitaminei K

• 1948 ***Hogeboom, Schneider şi Palade*** au utilizat metoda centrifugării diferenţiale pentru fracţionarea celulară

• 1950 ***Pauling şi Corey*** au propus structura în α - helix a α - keratinelor

• 1950 - 1953 ***Chargaff*** a descoperit echivalenţele de baze în ADN

• 1951 ***Lynen*** a postulat rolul CoA în oxidarea acizilor graşi

• 1952 - 1954 ***Zamecnik*** a descoperit sediul sintezei proteice

• 1953 ***Sanger şi Thompson*** au determinat secvenţa de aminoacizi a lanţurilor A şi B ale Insulinei; doi ani mai târziu, Sanger a stabilit poziţia legăturilor disulfurice

• 1953 ***Watson şi Crick*** au postulat modelul în dublu α-helix al structurii ADN

• 1957 ***Sutherland*** a descoperit AMPc

• 1958 ***Crick*** a enunţat dogma centrală a geneticii moleculare

• 1960 ***Kendrew*** a utilizat analiza cu raze X de înaltă rezoluţie pentru determinarea structurii mioglobinei de caşalot

• 1961 ***Jacob, Monod şi Changeux*** au propus o teorie a funcţiei şi acţiunii enzimelor alosterice

• 1961 ***Jacob şi Monod*** au postulat funcţia ARN-ului mesager

• 1961 - 1965 laboratoarele lui ***Nirenberg, Khorana şi Ochoa*** au identificat codul genetic

• 1973 ***Cohen, Chang, Boyer şi Helling*** au raportat primele experimente de clonare a ADN-ului

• 1978 ***Tonegawa*** a demonstrat secvenţa ADN a genei unei imunoglobuline

• 1981 - 1982 ***Palmiter şi Brinster*** au obţinut şoarecele transgenic

• 1983 ***Barbara Mc Clintock*** descoperă structurile genetice mobile

• 1983 ***Mullis*** a amplificat ADN-ul prin reacţia polimerazică în lanţ (PCR)

• 1984 ***Niels, Kohler, Milstein*** – descoperirea principiului de sinteză a anticorpilor monoclonali

• 1985 ***Brown şi Goldstein*** - premiul Nobel pentru descoperirea receptorilor LDL şi rolului acestora în controlul metabolismului colesterolului şi ateroscleroză

• 1986 ***Cohen şi Levi-Montalcinin*** - premiul Nobel pentru descoperirea factorilor de creştere

• 1987 ***Tonegawa*** - premiul Nobel pentru descoperirea principiului genetic al generării diversităţii anticorpilor

• 1989 ***Bishop şi Varmus*** - premiul Nobel pentru descoperirea originii celulare a oncogenelor retrovirale

• 1992 ***Fischer şi Krebs*** – mecanismul reglator biologic al fosforilării reversibile a proteinelor

• 1994 ***Gilman şi Rodbell*** - premiul Nobel pentru descoperirea proteinelor G şi rolului lor în transmiterea semnalelor intracelular

• 1997 ***Prusiner*** - premiul Nobel pentru descoperirea Prionilor şi a rolului acestora în infecţii

• 1998 ***Furchott, Ignarro şi Murad*** - rolul NO în activitatea sistemului cardiovascular

• 1999 ***Gunter Blobel*** - premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru descoperirea faptului că proteinele au semnale intrinseci care guvernează transportul acestora şi localizarea în celulă

• 2000 ***Arvid Carlsson, Paul Greengard, Eric R Kandel*** - premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru descoperirile lor în ceea ce priveşte transducţia semnalelor în sistemul nervos

• 2001 ***Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt, Paul M. Nurse*** - premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru descoperirile lor legate de aspecte cheie ale ciclului celular

• 2002 ***Sydney Brenner, H. Robert Horvitz, John E. Sulston*** - premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru descoperirile lor privind reglarea genetică a dezvoltării organelor şi moartea celulară programată

• 2003 ***Lauterbur şi Mansfield*** - premiul Nobel pentru descoperirea rolului rezonanţei magnetice în imagistica medicală

• 2004 ***Axel şi Buck*** - premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru descoperirea recep-

torilor olfactivi; ***Ciechanover, Hershko şi Rose*** au primit premiul Nobel pentru chimie pentru descoperirea ubiquitinelor

- 2005 ***Marshall şi Warren*** - premiul Nobel pentru descoperirea rolului în gastrite şi ulcerul peptic al *Helicobacter Pylori*
- 2006 ***Andrew Z. Fire, Craig C. Mello*** au primit premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru că au elucidat un mecanism natural de control al fluxului informaţional genetic (inhibarea prin interferenţă a ARN de către ARN dublu catenar)
- 2007 ***Sir Martin Evans, Mario Capecchi şi Oliver Smithies*** au primit premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru cercetările în domeniul modificărilor genetice realizate prin intermediul celulelor stem
- 2008 ***Luc Montagnier şi Francoise Barre-Sinnoussi*** au primit premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină, pentru descoperirea HIV şi respectiv, ***Harald zur Hausen*** pentru descoperirea faptului că HPV cauzează cancer de col uterin
- 2009 ***Jack W. Szostak , Carol W. Greider şi Elizabeth Blackburn*** au primit premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină pentru descoperirea telomerazelor

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anexa 3.
Valorile normale şi limitele de decizie clinică ale testelor de laborator

Interpretarea rezultatelor testelor de laborator se bazează pe compararea acestora cu valorile de referinţă. Valorile de referinţă (numite adeseori şi "valori normale") sunt valori ale concentraţiei substanţelor sau activităţii enzimatice, obţinute la populaţia de referinţă, care este în mod normal un grup de indivizi sănătoşi. Dacă aceste valori prezintă o distribuţie normală (gaussiană), scara folosită ca referinţă este populaţia de mijloc ± 2 deviaţii standard (acesta constituie intervalul central de distribuţie – 95%). Când este observată o distribuţie non – gaussiană într-o populaţie, valorile transformate matematic (de exemplu transformate logaritmic), sunt folosite pentru a obţine o distribuţie normală. Dacă valorile se găsesc în afara intervalului de referinţă se spune că rezultatele variază faţă de cele observate la populaţia de referinţă. De notat este faptul că acestea nu sunt neapărat anormale: prin definiţie, 5% dintre indivizii unei populaţii de referinţă, vor avea rezultate în afara intervalului de referinţă. Oricum, cu cât rezultatele sunt mai îndepărtate de intervalul de referinţă, cu atât este mai probabil ca acestea să se asocieze cu stări patologice.

În unele cazuri (precum în cazul măsurării glucozei, lipidelor, sau troponinei cardiace), în loc de valori de referinţă, folosim limite de decizie clinică: acestea sunt de obicei derivate din studiile epidemiologice, legând nivelele unui anumit analit de prezenţa sau riscul apariţiei anumitor boli.

Mai jos am enumerat intevalele de referinţă ale mai multor teste de laborator uzuale. De notat că intervalele de referinţă pot fi dependente de vârsta şi sex. De asemenea, ele pot fi diferite în sângele arterial şi venos şi pot fi influenţate de postura, perioadele de post alimentar şi anumite diete. Discuţiile detaliate asupra factorilor care influenţează rezultatele testelor nu sunt scopul acestei anexe: cititorul poate apela la tratatele biochimice de specialitate. Valorile de referinţă date în continuare sunt doar orientative: este un semn de bună practică în laboratorul de analize medicale ca totdeauna să se verifice intervalele de referinţă date. Pe de altă parte, limitele de decizie clinică pentru mulţi analiţi (inclusiv glucoza şi lipidele serice) sunt independente de laborator, deoarece aceste măsurători folosesc metode standardizate şi controale de calitate adecvate.

Valorile de referinţă pentru anumite teste de laborator

(Intervalele de referinţă sunt date pentru ser, dacă nu sunt alte categorii citate)

1. Numărătoarea elementelor sanguine

- Hematocritul: 36 – 46 % (femei), 37 – 49 % (bărbaţi)
- Hemoglobina: bărbaţi 13 – 18 g/dL, femei: 12 – 16 g/dL; g/L= g/dL x 10
- Numărul de eritrocite: bărbaţi: 4,4 – 5,9 x 10^{12}/μL, femei:3,8 – 5,2 x 10^{12}/μL
- Volumul eritrocitar mediu (VEM): normal 80 – 100 fL
- Numărul de leucocite: 4 – 11 x 10^{3}/μL

BCU MEDICINA

- Numărul de trombocite: 150 – 450 x $10^3/\mu L$
- Carboxihemoglobina (% din hemoglobina totală): 0,5 – 1,0%

2. Testele de coagulare:

- Timpul parțial de tromboplastină activată (APTT): 30 – 50 secunde
- Timpul de protrombină: 10 – 15 secunde
- Timpul de trombină: 10 – 15 secunde
- D – dimerii de fibrină: < 0,25 g/L

3. Profilul electrolitic (urea şi electroliții)

- Sodiu: 135 – 145 mmol/L
- Potasiu: 3,5 – 5,0 mmol/L
- Bicarbonat: 20 – 25 mmol/L
- Ureea: 2,5 – 6,5 mmol/L (16,2 – 39 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: mmol/L x 6,02 = mg/dL
- Azotul ureic (BUN): 2,5 – 6,5 mmol/L (7 – 18,2 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,357
- Creatinina: 20 – 107 µmol/L (0,23 – 1,20 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: µmol/L x 0,0113 = mg/dL
- Lacuna anionică: 5 – 15 mmol/L
- Osmolaritatea: 285 – 295 mOsmol/L
- Magneziu: 0,7 – 1,1 mmol/L (1,7 – 2,64 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,411

4. Calciu şi fosfor:

- Calciu seric total: 2,2 – 2,6 mmol/L (8,8 – 10,4 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: mmol/L= mg/dL x 0,25
- Calciu ionic: 1,1 – 1,3 mmol/L (4,4 – 5,2 mg/dL)
- Fosfați (exprimați ca şi fosfor): 0,7 – 1,4 mmol/L (2,2 – 5,6 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,323
- Hormon paratiroidian (PTH): 1,1 – 6,9 pmol/L (11 – 69 pg/mL)

5. Proteinele serice:

- Proteine serice totale: 63 – 86 g/L
  Conversia în unitățile SI: g/L= g/dl x10
- Albumina: 35 – 45 g/L
- Proteine urinare excretate: < 0,15 g/24h
- Excreția de albumine – microalbuminuria < 30 mg/24h sau < 30 mg/mg creatinina
- Proteina C reactivă: < 10 mg/L
- Proteina C reactivă printr-o metodă cu senzitivitate mare (cantitate sub 10 mg/L), este folosită pentru evaluarea riscului acut cardiovascular
- Transtiretina (prealbumina): 0,2 – 0,5 g/L

6. Metale detectate şi proteine care leagă metale:

- Cupru: 12 – 25 µmol/L (80 – 160 µg/dL)
  Conversia la unitățile SI: µmol/L = µg/dl x 0,157
- Cuprul urinar excretat: 0,2 – 1,6 µmol/24h (6 – 10 mg/24h)
  Conversia în unitățile SI: mmol/24h = µg/24h x 0,0157
- Ceruloplasmina: 200 – 450 mh/L (20 – 45 mg/dl)
- Fier: 10 – 30 µmol/L (56 – 167 mg/dL)
  Conversia în unitățile SI: mmol/L = µg/dL x 0,179

BCU ASE THE UNIVERSITY LIBRARY

- Feritina: 30 – 280 mg/L. Conversia la SI: mg/L = ng/mL
- Seleniu: 0,8 – 2,0 µmol/L (6 – 16 mg/dL)
  Conversia la unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 7,9
- Zinc: 9 – 20 µmol/L (60 – 130 µg/dL)
  Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,153
- Transferina: 2,2 – 4,0 g/L

7. Glucoza şi hemoglobina glicozilată:

Glucoza plasmatică:

- interval normal: 4,0 – 5,5 mmol/L (72 – 99 mg/dL)
  Conversia la unităţile SI: mmol/L x 18 = mg/dL
- *à jeun* (fără aport caloric aproximativ 10 h): sub 5,5 mmol/L (< 100 mg/dL)
- Valori *à jeun* de graniţă: peste 5,5 mmol/L, dar sub 7,0 mmol/L (126 mg/dL)
- Diabet: 7,0 mmol/L (126 mg/dL) sau peste

Testul de toleranţă la glucoză administrată oral (TTOG): glucoza plasmatică creşte la o concentraţie de vârf după aproximativ 60 minute şi revine la valori apropiate de cele a jeune în 120 minute. Dacă valoarea rămâne peste 11,1 mmol/L (200 mg/dL) la 120 minute, pacientul are diabet, chiar dacă glucoza a jeune este în limite normale. Dacă glucoza serică a jeune este normală, iar cea după încărcarea cu glucoză este între 5,5 şi 7,8 mmol/L (100 mg/dL şi respectiv 140 mg/dL) pacientul are toleranţa scazută la glucoză.

HbA1c:

- 4 – 6% din HbA totală. Nivele sub 7% indică un control acceptabil al diabetului. Nivele mai mari sugerează un control deficitar.

8. Lipidele:

- Colesterolul total: < 5 mmol/L (190 mg/dL)
- LDL – colesterol: optim < 2,6 mmol/L (<100 mg/dL)
- HDL – colesterol: 1 - 1,6 mmol/L (40 – 60 mg/dL)
  Conversia la unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,2586
- Trigliceridele: de dorit sub 1,7 mmol/L (150 mg/dL).
  Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,01129

9. Testele funcţiei hepatice:

- Bilirubina: <17 mmol/L (<1.0 mg/dL)
  Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 17,1
- Aspartat transaminaza AST: 5 – 45 U/L
- Alanin transaminaza: ALT: 5 – 40 U/L
- Fosfataza alcalină (ALP): 50 – 260 U/L; (ALP este crescută fiziologic la copii si adolescenţi)
- Gamma – glutamil transpeptidaza (GGT): bărbaţi < 90 U/L, femei < 50 U/L

10. Metaboliţii cheie:

- Amoniemia: 15 – 88 µmol/L (25 – 150 µg/dL)
  Conversia în unităţile SI: µmol/Lx 1,7 = µg/dl
- Lactat: 0,7 – 1,8 mmol/L (6 – 16 mg/dl)
  Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,111
- Porfobilinogen urinar: < 9 µmol/24h (<2 mg/24h)
  Conversia în unităţile SI: µmoL/24h = mg/24h x 4,42
- Piruvat arterial: 0,2 – 0,8 mmol/L (0,2 – 0,7 mg/dL)
  Conversia în unităţile SI: mmol/L= mg/dL x 0,114

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Urat: 0,20 – 0,5 mmol/L (3,5 – 8,0 mg/dL) la bărbaţi; 0,1 – 0,4 mmol/L (2,5 – 6,2 mg/dL) la femei

Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,0595

11. Gazometria sanguină:

- Concentraţia arterială de ioni de hidrogen: 36 – 43 nmol/L (pH: 7,37 – 7,44)
- pCO2: 4,6 – 6,0 kPa (34 – 45 mmHg)
- pO2: 10,5 – 13,5 kPa (79 – 101 mmHg)

Conversia în unităţile SI: kPa x 7,5 = mmHg

12. LCR

- Raportul concentraţiilor glucozei din LCR şi plasmatică: 0,65
- Lactatul din LCR: < 2,2 mmol/L (< 20 mg/dL)

Conversia la unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,111

13. Teste endocrine

Determinări ale funcţiei tiroidei

- TSH: 0,4 – 4 mU/L

Conversia la unităţile SI: mU/L = μU/dL

- Tiroxina: (T4): 55 – 144 nmol (4,2 – 11 μg/dL)

Conversia la unităţile SI: nmol/L= μg/dL x 12,87

- Triiodotironina (T3): 0,9 – 2,8 nmol/L (0,6 – 1,8 ng/mL)

Conversia la unităţile SI: nmol/L = ng/mL x 1,54

Determinări ale funcţiei suprarenalei

- Cortizolul la ora 08.00: 190 – 690 nmol/L (7 – 25 μg/dL)
- Cortizolul la ora 24.00: < 50 nmol/L (< 2μg/dL)
- Cortizolul liber urinar: < 250 nmol/24h

Conversia la unităţile SI: nmol/L = μg/dL x 27,59

- ACTH: <80 ng/L

Conversia la unităţile SI: ng/L = pg/ml

- 17 – hidroxiprogesteron: < 50 nmol/L (< 16 pg/L)

Conversia la unităţile SI: nmol/L= 3.026 x pg/L

- Aldosteron bazal 83 – 277 pmol/L (3 – 10 ng/dL), de virf: 139 – 832 pmol/L (5 – 30 ng/dL)

Conversia la unităţile SI: pmol/L = 27,74 x ng/dL

Dietele sărate influenţează rezultatele.

14. Diagnosticul infarctului miocardic:

Troponinele cardiace (de notat ca limitele de decizie cliniă pentru troponinele cardiace pot varia în diferite laboratoare)

- Troponina T: > 0,1 ng/mL
- Troponina I: >2,5 ng/mL
- Creatin kinaza CK: < 210 U/L
- Raportul fracţiuniicreatin kinază CK – MB şi CK totală: CK–MB/CK<6%

15. Markeri ai pancreatitei:

- Amilaza: 0 – 100 U/L
- Lipaza: 20 – 140 U/L

BCU MEDICINA CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

16. Neurotransmiţători şi metaboliţii lor:

- Norepinefrina: 1094 – 1625 pmol/L (185 – 275 ng/L)
- Norepinefrina urinară: <900 nmol/24h (<152 mg/24h)
  Conversia la unităţile SI: pmol/L = ng/L x 5.9
- Epinefrina: 164 – 464 pmol/L (30 – 85 ng/L)
  Conversia la unităţile SI: pmol/L = ng/L x 5,5
- Epinefrina urinară: < 230 nmol/24h (<42 mg/24h)
- Acidul vanil mandelic urinar (VMA): < 35,5 mmol/24h (< 7,0 mg/24h)
  Conversia la unităţile SI: µmol/24h = mg/24h x 5,05
- Acidul 5 – hidroxi indolacetic urinar (5 – HIAA): metabolitul major al 5- HT; interval de referinţă: 10 – 52 mmol/ 24h (3 – 14 mg/ 24 h)
  Conversia la unităţile SI: mmol/24 h = mg/24 h x 5,24

17. Vitaminele:

- Vitamina A: 1,05 – 2,8 µmol/L (300 – 800 µg/dL)
  Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 0,0349
- Vitamina B 6 (piridoxal fosfat): 5 – 50 µg/L , deficienţa < 3 µg/L
- Vitamina B 12: 148 – 590 pmol/L (200 – 800 pg/mL)
  Conversia în unităţile SI: pmol/L = pg/ml x 0,7378
- Vitamina C plasmatică: 0,6 – 2,0 mg/dL, nivele plasmatice acceptabile 0,30 mg/dl, în leucocite >15 mg/dL.
  Conversia în unităţile SI: mmol/L = mg/dL x 56,8
- Vitamina D (25–OH D3): iarna 35 – 104 pmol/L (14 – 42 ng/mL); vara: 37 – 197 pmol/L (15 – 80 ng/mL)
  Conversia în unităţile SI: pmol/L = ng/ml x 2,469
- Vitamina E: 11,6 – 37,1 µmol/L (0,5 – 1,6 mg/dL)
  Conversia în unităţile SI: µmol/L= µg/dl x 23,22
- Folaţi: > 7 nmol/L (3 ng/mL)
  Conversia în unităţile SI: nmol/L = ng/mL x 2,27
- Folaţii din hematii: 362 – 1586 nmol/L (160 – 700 ng/mL)
  Conversia în unităţile SI: nmol/L = ng/mL x 2,266

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anexa 4. Index de subiecte

5

5-nucleotidaza.....485

A

ABC A1 (ATP-binding cassette transporter A1) 132, 137
Acetil CoA. 71, 77, 101, 103, 107, 117, 133, 134, 164-166, 173, 174, 231, 234, 307, 532, 533, 536
Acetilcolina....100, 226, 227, 296, 297, 310, 313, 504-506
Acetona.....64, 73, 109, 117, 134, 337
Acid acetic.....203, 478, 479, 515
Acid arahidonic.....122, 268, 312, 314-317
Acid aspartic.....164, 189, 195
Acid chenodeoxicolic.....487
Acid colic.....487, 516
Acid deoxicolic.....487
Acid docosahexanoic (ADH). 12-15, 18, 20, 122, 134, 148, 341-347, 366, 440, 441, 461, 466, 467, 481
Acid eicosapentanoic (AEP).....122, 148
Acid folic.....70, 79, 80, 90, 166, 170, 172, 229, 230, 246, 247
Acid glicocolic.....487, 516
Acid glutamic.....53, 89, 157, 164, 165, 175, 225, 255, 269, 270, 280
Acid homogentizinic.....470
Acid homovanilic (HVA).....254
Acid lactic 33, 34, 36, 39, 47, 100, 101, 111, 256, 257, 486, 492, 507, 531
Acid litocolic.....487
Acid para amino hipuric (PAH).....253, 254, 464, 465, 467
Acid uric.....34, 38, 76, 136, 139, 148, 149, 197-200, 459, 460, 465, 479, 483, 484
Acidoza.....19, 20, 31, 38-43, 86, 116, 117, 177, 246, 280, 470, 471, 482, 483, 520
Metabolica. .19, 20, 31, 40, 42, 117, 471, 482, 483
Respiratorie.....39, 40, 42, 43
Acidoza tubulara renala.....19, 40, 471
Acizi biliari.....85, 101, 105, 121, 129, 130, 132, 146, 168, 239, 250, 251, 486-490, 493, 499, 509, 511, 516
Acizi grasi.2, 4, 28, 33, 34, 37, 76-78, 81, 82, 88, 101, 103, 105-107, 109-112, 116, 117, 121-123, 127-129, 132, 133, 147, 148, 151, 162, 174, 176, 189, 231, 232, 234, 286, 305, 312-316, 323, 324, 352, 357, 423, 463, 486, 514, 515, 531, 532
ACP (Acyl carrier protein).....250
Actina.....246, 262, 309, 422, 435, 491, 526-530, 534
ADAMTS-13.....266, 267
Addis - Hamburger.....479
ADH (Hormonul antidiuretic)..12-15, 18, 20, 81, 122, 134, 266, 272, 280, 304, 310, 321, 335, 341-348, 366, 440, 441, 459, 461, 466, 467, 471, 481
ADN fosil.....394
ADN mitocondrial (ADNmt).....383
ADN polimeraza.....385, 387
ADN polimeraza I (Pol I).....385
Adrenalina 99, 108, 109, 111, 263, 266, 268, 280, 299, 304, 360, 437, 463
Afibrinogenemie.....276
Alanin Transferaza (ALT).....101, 163, 199, 224
Alanina.....76, 95, 101, 106, 165, 174, 175
Albinism.....158, 172
Albumina 23, 24, 62, 64, 95, 109, 114, 116, 123, 127, 130, 137, 147, 184, 185, 189, 190, 192, 199-201, 205, 206, 285, 292, 353, 356, 362, 464, 471, 472, 479, 491, 493, 494, 496, 500-502, 521
Plasmatica 24, 130, 189, 190, 356, 491, 501
Alcaloza 15, 19, 37, 39-43, 441
Metabolica 15, 40-43

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

Respiratorie 37, 39-43
Alcaptonuria 158, 172
Alcaptonurie 158, 171, 172, 470
Alcool 49, 66, 73, 121, 136, 141, 145, 149, 201, 239, 240, 245, 487, 501, 502, 505, 507, 517, 518
Aldolaza 245, 473, 486, 490
Aldosteron 10-13, 15, 19, 21, 30, 459, 461, 463, 466
Alfa fetoproteina (AFP) 425, 429, 450-453, 458, 491
Amilaza serica 233, 250, 251, 517, 519, 520
Amilazurie 250, 517, 519
Aminoacidurie 157, 158, 470
Amoniac 38, 157, 163-166, 175, 486, 487, 492
Amoniemia 164, 165
AMP (adenozin monofosfat) 99, 100, 102, 107, 164, 232, 235, 305-307, 318-320, 377, 381, 393, 407, 409
AMPc 13, 14, 28, 97-100, 107, 108, 236, 285, 294, 297-299, 303-310, 313, 316-318, 328, 336, 339, 344, 412, 413, 506
Anemie 43, 52-54, 56-58, 60-62, 65, 66, 69, 73, 74, 79-81, 88, 90, 197, 199, 200, 208, 243, 246, 247, 257, 374, 396, 459, 481, 483, 500, 505, 507, 510, 515, 535
Anemii hemolitice 247
Anemii megaloblastice 246, 247
Anexina A-5 280
Angiotensina 11, 12, 19, 21, 150, 271, 310, 343, 459, 463
Angiotensina (AT) 11-13, 19, 21, 123, 127, 130-133, 150, 191, 192, 199, 200, 271, 276, 277, 279, 284-286, 288, 289, 310, 343, 459, 463
Anhidraza carbonica 36, 37, 47, 182, 504, 507
ANP (Peptidul Natriuretic Atrial) 12, 13, 463
Anti-codon 410
Anticoagulanti circulanti 287
Anticorp 64, 65, 74, 77, 94, 114-116, 140, 143, 183, 195, 196, 205, 209, 215-220, 232, 246, 263, 274, 287, 288, 326, 332-334, 337, 341, 355, 356, 362-365, 424-426, 429, 431-433, 447, 450, 479, 491, 501, 503, 509, 511
Anticorpi antifosfolipide 287
Antigen 64, 94, 95, 143, 194-196, 215-220, 250, 263, 267, 269, 275, 277, 279, 282, 288, 290, 362-364, 424-428, 430, 431, 433, 435, 436, 445, 447, 450-452, 457, 480, 490, 491, 503, 511
Antigen carcinoembrionar (CEA). .195, 424-431, 435, 450, 452, 453, 458
Antigen polipeptidic tisular (TPA).435, 436, 444, 450, 453
Antigen specific prostatei (PSA)...250, 424, 425, 433, 434, 442, 450, 451, 453
Antigene de diferentiere celulara.....425
Antigene onco-fetale.....424, 425
Antigenul carcino-embrionar (CEA).....195, 424-431, 435, 450, 452, 453, 458
Antigenul celulelor carcinomatoase scuamoase (SCC).....435, 457
Antigenul gastro-intestinal - CA 72-4....431, 452, 457, 458
Antigenul gastro-intestinal CA19-9:.....430, 431, 458
Antigenul ovarian - CA 125 (carbohydrate antigen 125.....433, 450, 452, 453
Antigenul polipeptidic tisular (TPA).....435, 436, 444, 450, 453
Antigenul specific prostatic - PSA 250, 424, 425, 433, 434, 442, 450, 451, 453
Antigenul tumoral al vezicii urinare (Bladder Tumor Antigen - BTA).....436, 453
Antigenul tumorilor mamare - CA 15-3 431, 432, 435, 450, 452, 457
Antitrombina III (AT III).....191, 192, 199, 259, 276, 277, 279, 284-286, 288, 481
Antivitamine K (AVK).....274
Apo AI Milano.....132
Apoproteine 59, 72, 116, 123, 124, 128, 129, 132, 136, 182, 184, 191, 280
Apoptoza..83, 269, 309, 352, 373, 374, 391, 421-423, 454
APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxilation).....437
APUD-oame.....437-440
Aquaporine (AQP).....14, 15, 344, 345
Arginina. 109, 159, 164, 165, 167, 168, 226, 282, 302, 324, 326, 327, 343, 406, 408
ARN de transfer (ARNt). 397, 405, 408-410, 414
ARN mesager (ARNm). 184, 237, 238, 359, 397-399, 402-412, 414, 416-418, 427, 445, 454, 455
ARN ribozomal.....380, 383
Asparagina.....175, 185, 248, 406
Aspartat Transferaza (AST)...163, 199, 224, 246, 501, 502, 518
Ateroscleroza. .113, 116, 121, 125, 136, 138-140, 142, 147, 150, 170, 278
ATP sintaza.....383
ATP-aza Na+/K+.....6, 11

B

Bariera hemato-encefalica (BHE).....185, 186
Baze tampon.....36
Bazele azotate.....376
BCKADH (branched chain ketoacid dehydrogenase).....255
Bcl-2.....422
Bence Jones (proteinuria).....197-200, 208, 424, 453, 472
Beriberi.....69-71, 90
Bicarbonat.2, 8, 11, 20, 23, 25, 31, 33-43, 47, 70, 117, 118, 460, 471, 483, 503, 504, 519, 521
Bilirubina directa (conjugata).....62-64, 66, 200, 201, 479, 487, 489, 493-496, 498-500
Bilirubina neconjugata..62, 63, 66, 494, 496, 497
Bilirubina totala.....64, 200, 201, 431, 496
Biliverdina.....493
Boala Hartnup.....75, 174, 470, 515
Boala Joseph.....396, 419, 470
Boala Paget.....29, 30, 249
Boala trofoblastica gestationala.....452
Boala urinii cu miros de artar.....176, 255
Boala von Willebrand.....267, 275, 287

C

C4b-BP (C4b Binding Protein).....278
CA 125.....433, 450, 452, 453
CA 15-3.....431, 432, 435, 450, 452, 457
CA 19-9.....431, 450, 452, 453, 458
CA 72-4.....431, 452, 457, 458
Calbindin D.....23, 26
Calcitonina.26, 27, 193, 310, 359, 425, 439, 440, 450
Calcitriol.....25-28, 85, 323
Calciu ionic (Ca2+). .11, 23-25, 43, 97, 129, 183, 189, 193, 209, 229, 235, 270, 294, 299, 303, 304, 306, 308-312, 317, 318, 322, 324, 330, 344, 446, 483, 484, 503-505, 527-530, 534, 536, 538, 539
Calciu total (Ca).....23, 24, 199
Calculi biliari.....487, 489
Calmodulina.....11, 23, 97-99, 235, 309, 527, 528
Cancer colorectal.....375, 382, 394, 424, 452
Cancer mamar.....250, 285, 432, 435, 444, 452
Cancerul colorectal.....375, 382, 394, 424, 452
Cancerul de vezica urinara.....436, 453
Cancerul gastric.....431, 452
Cancerul hepatic.....452
Cancerul mamar.....250, 285, 432, 435, 444, 452
Cancerul ovarian.....378, 433, 452
Cancerul pancreatic.....452, 519
Cancerul prostatic. .361, 424, 434, 435, 442, 451, 453
Cancerul pulmonar.....443, 453
Cancerul testicular.....248, 453
Carbaminohemoglobina.....48
Carboxihemoglobina.....48
Carcinom al prostatei.....249, 250
Caseta Pribnow.....400
Caspazele.....422
Catalaza.....62, 493
Catalizatori.....122, 223
Catecolamine. 100, 172, 302, 304, 310, 360, 367, 437, 439, 450, 504, 533, 539
Celule Kupffer.....485, 490
Centromer.....371
Centru activ25, 51, 168, 192, 225, 227, 230, 231, 235, 241, 269-271, 273, 278, 279, 281, 282
CERP (Cholesterol Efflux Regulatory Protein).....132
Ceruloplasmina..59, 182, 192-194, 227, 481, 491
Cetoacidoza.....11, 21, 29, 40, 42, 113, 114, 116, 118, 520
Cetoacidoza diabetica (CAD) 11, 21, 29, 40, 116, 118, 520
CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein)....129, 131, 132, 146
Chaperone.....371, 386, 387, 391
Chilomicroni.....82, 88, 123-127, 129, 134-137, 148, 512, 515
Ciclooxigenaza.....231, 263, 316
Ciclul alaninei.....101
Ciclul Cori.....101, 486
Ciclul Krebs. 4, 71, 100, 101, 103, 105, 110, 112, 133, 164-166, 175, 424, 463, 486, 531-534, 536
Circuit enterohepatic.85, 146, 487, 489, 494, 511
Ciroza.....60, 61, 67, 80, 83, 164, 194, 195, 197, 199, 201, 208, 267, 277, 282, 283, 286, 345, 425, 427, 429, 433, 435, 436, 452, 488, 489, 491, 501, 502, 519
Cisteina. .101, 128, 132, 157, 159, 165, 168, 170, 189, 297, 317, 341, 415, 479
Cistina.....145, 168, 169, 465, 470, 479, 483
Cistinuria.....158, 168, 469, 470
Citocromi. 45, 50, 51, 58, 85, 104, 146, 182, 229, 239, 289, 351, 360, 383, 492, 493, 539
Citokine proinflamatorii 267, 269, 281, 283, 288, 316, 335
Citrulina.....164
CK - Creatinkinaza 149, 167, 200, 224, 233, 234, 240-246, 250, 442, 536
CKBB.....242

CKMB.....242, 244, 245
CKMM.....242, 244, 245, 250
Clearance....78, 86, 240, 322, 399, 404, 464-469, 472, 480, 513, 520, 535
de creatinina.....469, 480, 520
CLIP (corticotropin-like intermediary peptide) 336
Clorura (Cl-)...2, 8, 10, 11, 21, 36, 37, 39, 42, 43, 127, 145, 306, 461, 466, 504, 505, 510, 516
CMP (citidin monofosfat).....377, 381, 393, 409
Coagulare intravasculara diseminata (CID)...266, 272, 274, 277, 279, 283-286
Codon.....275, 408, 410
Coenzima Q.....88, 228, 537
Coenzime.....58, 72, 73, 75, 79, 80, 88, 94, 104, 105, 166, 227-229, 361, 532
Cofactorul II al heparinei (HC II).....277
Colagen.....30, 81, 128, 143, 182, 268, 271
Colagen 23, 91, 128, 142, 143, 183, 261, 263, 266, 268, 273
Colecalciferol (vitamina D3)....25, 26, 32, 84-86, 459
Colestaza.....239, 502
Colestaza 252, 499, 500
Colesterol...76, 88, 101, 105, 106, 116, 121, 123, 124, 126-132, 134-141, 143, 145-150, 174, 230-232, 240, 255, 336, 352, 360, 474, 479, 481, 486-489, 492, 499, 522
Seric.....88
Colinesteraza. .192, 224-227, 234, 240, 241, 244, 245, 248, 252, 256
Coma hiperosmolara.....17, 114, 116-118
Complement (sistem).....95
Complex enzima-substrat.....225, 230, 272
Constanta Michaelis (Km).....228
Contractia miocardica.....525, 528, 529, 533
Corpi cetonici.....11, 15, 34, 36, 37, 42, 66, 101, 103, 107, 109, 110, 112, 117, 118, 134, 162, 165, 463, 464, 486, 531, 533
Corticoliberina 335-337, 361
Corticotropina.....304
Cortizol.....81, 108, 109, 111, 238, 292, 316, 326, 335-337, 349, 361, 367, 481, 488
Creatina.....167, 464
Creatinina.....20-22, 39, 118, 147, 167, 199, 200, 224, 234, 285, 367, 459, 460, 463, 464, 467-469, 472, 479-483, 520
CREBP (cAMP-Response Element-Binding Protein).....405
Crioglobuline.....197, 209
Cromatide.....371, 380, 381
Cromatina.....369, 370, 380, 391, 405, 414, 416
Cromozomi....159, 338, 369, 371, 373, 379, 381, 383, 384, 415
CTP- citrate transporter protein.....424
Cupru.....172, 193, 194, 415
Cushing (sindrom).....21, 30, 336, 337, 439, 469, 481
CYFRA.....435, 457, 458
CYFRA 21-1.....435, 457, 458

D

D dimeri (D-D).....282
DAMP (deoxiadenozin monofosfat).....377, 388
Datorie de oxigen (O_2).....531
DCMP (deoxicitidin monofosfat).....377
Deletie.....328, 384
Derepresie.....26, 236-239
Dermatansulfat.....277, 286
Deshidratare. 7, 13, 15, 16, 20, 91, 117, 118, 181, 189, 345-347, 513
DGMP (deoxiguanozin monofosfat).....377
Diabet insipid.....15, 345, 346, 471
Diabetul Autoimun Latent al Adultului (LADA) 114, 115
Diacilglicerol (DAG).....11, 14, 97, 99, 183, 310-314, 318, 330, 331
Diagrama Gamble.....6
Diagrama Reiber.....186
Diiodtirozina.....173, 351
Disfibrinogenemii.....272, 275, 276, 283
Dislipidemii.....76, 116, 126, 132, 134-140, 144, 145, 147, 149, 151
Primare.....134
Secundare.....135, 137, 144, 145
Disproteinemii.....135, 190, 198, 490, 491
Distrofie musculara.....245
Down (sindrom).....382, 423, 429, 432
DTMP (deoxitimidin monofosfat).....80, 377
Dubin-Johnson (sindrom).....499, 500

E

Ecuația Michaelis-Menten.....227
Edeme.....10, 18, 21, 64, 65, 71, 81, 88, 90, 189, 190, 206, 345, 468, 479-481, 510
EGF (epidermal growth factor).....128, 294, 295, 328, 351
Electroforeza proteinelor.....197, 199, 200, 205, 208, 209, 479, 481, 502
Enolaza.....442, 443
Enolaza neuron specifica- NSE.....442, 443, 451, 453

Enzima de conversie a angiotensinei (ACE)...11, 463
Ergocalciferol (vitamina D2).....84
Eritropoietina.....64, 323, 462, 464
Eroare de replicare.....382
Estrogeni 26, 29, 73, 85, 191, 194, 239, 293, 328, 338, 339, 354, 360, 432, 452
Etanol.....74, 487
Etilen diamino tetra acetat (EDTA). 54, 249, 268, 347, 361, 468, 522
Examen microscopic cantitativ.....479
Exoni.....380, 405, 406

F

Factor de creÅŸtere derivat din plachete (PDGF).....143
Factor de crestere derivat din plachete (PDGF) 143, 262, 284, 294, 295, 422
Factor II.....270
Factor IX.....259, 270
Factor plachetar IV (PF4).....262
Factor tisular...122, 259, 261, 269, 270, 278, 284
Factor V Leiden.....272, 279
Factor VIII.....261, 266, 268, 270, 272, 283, 286
Factor von Willebrand (vWF).259, 266, 267, 285
Factor X.....259, 270, 272, 280, 285
Factor XI.....271
Factor XII.....260, 264, 271, 272, 276, 281
FactorV.....270, 272, 279, 284
Fanconi (sindrom).....197, 469, 470
Fenilalanina.....165, 170-172, 226, 253
Fenilalaninhidroxilaza (PAH) 253, 254, 464, 465, 467
Fenilcetonuria.....170, 171, 253, 470
Fenobarbital.....66, 80, 239, 240, 488, 498
Feocromocitom.....437, 439
Feritina 43, 53, 58-61, 67, 81, 182, 190, 191, 200, 444, 445, 487, 490, 491, 510
Fibrati.....76, 146, 147, 534
Fibrina....125, 192, 209, 226, 248, 259-261, 264, 269, 270, 272, 273, 275, 276, 280-286, 288, 477, 480
Fibrinogen 76, 147, 185, 192, 193, 199, 208, 209, 259, 262, 263, 268-270, 272-276, 280, 282-286, 288, 479, 481, 485
Fibrinogenoliza.....282
Fibrinoliza.....125, 142, 184, 234, 259-261, 264, 265, 270-273, 276, 280-286
Fibrinopeptid A.....272, 284
Fibrinopeptid B.....273
Fibronectina....183, 193, 199, 269, 272-274, 280, 285, 288
Fibroza chistica.....83, 252, 510, 515, 517-519
Fier..43, 45, 46, 48, 49, 53, 55, 57-62, 67, 81, 82, 190-192, 194, 200, 303, 418, 444, 445, 473, 481, 487, 491, 493, 509, 510
Flux biliar.....239, 488, 489, 498
Flux plasmatic renal (FPR).....462, 464, 467
Flux sanguin renal (FSR).....462-464
FosfaÅ£i.....126
Fosfataza acida 233, 234, 240, 241, 248-250, 442
Fosfataza acida prostatica - PAP.....442
Fosfataza alcalina (FAL = F Alc)...23, 26, 29-32, 66, 86, 91, 147, 189, 197, 198, 227, 232-234, 241, 245, 248, 249, 354, 362, 470, 472, 485, 492, 499-502, 519
Fosfati 4, 11, 23, 25, 26, 28-30, 34-36, 38, 39, 56, 72-74, 85, 86, 90, 98, 101-103, 105, 107, 111, 121, 153, 165, 167, 174, 192, 202-204, 228, 229, 235, 237, 249, 269, 304, 306, 310, 317, 375, 388, 389, 455, 464, 477, 478, 482-484, 529, 530, 532, 534
Fosfatidilinozitol 4,5-difosfat...14, 310-312, 318, 330, 331
Fosfoinozitol bifosfat (PIP2)....14, 310-312, 318, 330, 331
Fosfolipaza C 11, 14, 99, 236, 299, 310-312, 314, 318, 330, 331
Fosfolipide.....2, 37, 88, 121-124, 127, 129, 131, 132, 168, 225, 229, 232, 255, 262, 264, 269, 270, 272, 274, 278, 280, 287, 296, 303, 310-312, 314, 315, 317, 352, 486, 487, 489, 492, 499
Fosforilare 71, 97-100, 104, 105, 108, 123, 167, 228, 229, 233-236, 292, 295, 298, 299, 302, 303, 305-309, 311-314, 317, 323, 327, 331, 335, 336, 370, 373, 377, 380, 401, 404, 406, 423, 454, 455, 463, 492, 527, 528, 530, 534
Fosforilaza.....96, 98-100, 108, 235, 236
Fosforilazokinaza.....98
Fragment 1+2.....270
Fragmente Okazaki.....385, 387
Free PSA.....434

G

Galactoza.....93-96, 203, 411, 465, 486, 492, 509
Gastrina.....27, 439, 440, 459, 504-508, 517
Gene supresoare.....421-424
Genom.....297, 379-381, 384, 389-391, 455
GGT (?GT).....149, 201, 472, 501, 502
GGT (gGT).....149
Gilbert (sindrom).....177, 239, 498, 500, 501
Giraza.....390

Glicina49, 62, 101, 153, 156, 158, 165, 167, 168, 296, 489, 516, 522
Glicogen sintaza.....97, 99, 236
Glicohemoglobina.....49
Glicoliza aeroba.....103, 525, 531-534
Glicoliza anaeroba....39, 101-103, 105, 106, 442, 463, 492, 531-534, 536, 537
Glicoproteina Ia (GpIa).....263
GlicoproteinaIb (GpIb).....263, 266, 268
Globuline....24, 64, 126, 181, 182, 184, 190-192, 195, 197-200, 205-207, 215, 217, 292, 481, 486, 491, 501
Glomerulonefrita acuta.....21
Glucagon...99, 107-112, 118, 236, 304, 305, 307, 319, 326, 327, 359, 439, 459, 505, 506, 533
Glucokinaza.....97, 103, 106, 107, 111, 237, 406
GLUT (transportori de glucoza).....95-98
Glutamat decarboxilaza.....255
Glutamina...37, 38, 163, 175, 273, 382, 408, 492
GMP (guanozin monofosfat).....314, 377, 381
Gonadotropina corionica umana (hCG)...65, 248, 304, 331, 338, 341, 439-442, 450-453, 458
Granule dense.....263
Graves (boala).....333, 353

H

Haptoglobina...185, 191, 192, 206, 207, 473, 496
HDL-C.....146, 149, 150
HDL2.....123, 124, 127, 129, 132
HDL3.....116, 124, 127, 131, 132, 193
HeLa (linia de celule canceroase).....374
Hematurie...21, 31, 265, 282, 472, 476, 479, 484
Hemocromatoza28, 60-62, 67, 82, 115, 252, 445, 490, 491
Hemodializa.....22, 69, 72, 74, 289
Hemofilie.....267, 275, 276, 287
Hemofilie A.....267, 275, 276
Hemofilie B.....275
Hemoglobina.3, 20, 34, 35, 37, 43, 45-49, 51-53, 55-58, 61, 114, 116, 168, 182, 191, 199, 200, 226, 467, 476, 493, 501
Hemoglobina glicozilata (HbA1c).....49, 55, 116, 119, 150
Hemoglobinopatie.....53, 55
Hemoglobinurie.....288, 472, 473
Hemoliza.....49, 52, 53, 61, 64, 88, 90, 191, 207, 447, 496, 497, 500, 501
Hemosiderina.....58, 66, 81, 191
Hemosideroza.....61
Hemostaza primara.....259, 260, 268, 285
Heparansulfat.....277
Heparine.....127, 149, 274, 289
Heparine fractionate.....289
Hepatita acuta.....159, 244, 429, 500, 501
Hepatita cronica.....197, 429, 452, 491, 498
HER-2/neu.....432, 433
Heteroproteine.....45, 182
Hexokinaza.....97, 103, 106, 107, 532
Hidrogen gazos (H2).....143, 213, 304, 314, 316, 329, 504, 506, 507, 512
Hidroxiprolina.....30, 81, 158, 165
High molecular weight kininogen (HMWK).264, 269, 271, 272, 281, 282, 445
Hipercalcemie.26, 27, 29, 31, 197, 249, 354, 441
Hipercolesterolemie familiala.....76, 511
Hiperfenilalaninemia.....170, 171
Hipergamaglobulinemii.....197
Hiperglicemie.....17, 108, 110, 113-115, 117-119, 150, 325, 327, 437, 465
Hiperglicinemia.....166
Hiperlipoproteinemie.....76, 274
Hipernatremie.....7, 16, 345
Hiperparatiroidism....26-29, 31, 86, 91, 249, 285, 361, 441, 481, 483
Hiperpotasemie.....20, 21, 117, 118, 481, 482
Hipertermie maligna.....242, 246
Hipertiroidism.....69, 71, 83, 267, 272, 333, 334, 350, 352, 353, 442, 469
Hipertrigliceridemie.....15, 17, 76, 134-137, 139, 141, 147, 283, 517
Hiperventilatie.....40, 42, 43, 117
Hipoalbuminemie....17, 137, 189, 190, 199, 200, 206, 207, 480, 510
Hipocalcemie.....27-32, 43, 87, 481-483
Hipofiza.....13, 67, 109, 174, 321, 328, 330, 335, 336, 341, 348, 351, 353, 359, 365, 439
Hipofosfatazie.....249
Hipofosfatemie.....26, 29-32, 249
Hipomagneziemie.....25, 31, 32
Hiponatremie.....17-19, 118, 345, 346, 441
Hipoparatiroidism.....28, 31
Hipopituitarism.....326
Hipopotasemie.....11, 19, 21, 441, 471
Hipotalamus.....13, 174, 321, 324, 325, 329, 334, 335, 338, 342, 361
Hipotiroidism...84, 136, 137, 145, 242, 249, 326, 328, 331-334, 354, 356
Hipovolemie...14, 16, 19, 21, 118, 343, 345, 471, 481, 518
Histidina.....45, 48, 53, 159, 165, 175, 182, 189, 254, 465
Histidinemia.....175
Histone.....182, 369-371, 391, 393, 395
HLA.....61, 95, 113-115, 183, 195, 445, 511

HMG-CoA reductaza.....149, 230, 231
Holoproteine.....182
Homocisteina.....70, 79, 80, 142, 158, 169, 170
Homocistinuria.....158, 169
Hormonul corticotrop.....304, 325, 334-338, 344, 364, 439-441
Hormonul de crestere (GH).....26, 108, 109, 111, 321-329, 351, 361, 365, 367, 415
Peptide care determina eliberarea GH.....324, 325
Proteine care leaga GH.....322, 325, 365
Receptorul pentru GH.....322, 323, 325
Hormonul foliculostimulator.304, 325, 330, 338-341, 362, 440
Hormonul luteinizant.....127, 130, 131, 304, 325, 330, 338-341, 360, 361, 440, 441
Hormonul melanocitostimulator.....334, 336
Hormonul tireotrop.304, 321, 325, 330-334, 338, 351, 353, 354, 356, 362, 363, 440, 442
Anticorpi anti-receptor de TSH 333

I

Icter obstructiv.....430, 502, 519
IGF (insulin-like growth factor).....26, 323-327, 332, 351, 357, 361, 367, 441
Imunoglobuline A...186, 195-200, 208, 251, 287, 472, 479, 480, 487, 491, 503, 509, 511
Imunoglobuline D.....196, 197
Imunoglobuline E.....184, 196-198, 480
Imunoglobuline G.....64, 65, 140, 185, 186, 196-200, 208, 209, 219, 287, 327, 472, 480, 491, 511
Imunoglobuline M....64, 140, 186, 196-199, 208, 209, 220, 287, 472, 480, 491, 501, 511
Indexul de selectivitate al proteinuriei.....472
Inducere de enzime.....236, 238
Inductori.....237, 239, 240, 414, 488
Infarct miocardic acut (IMA)...60, 114, 138, 150, 192, 193, 328
Inhibitori alosterici.....98, 230
Inhibitori competitivi.....230
Inhibitori de proteaze.....184, 191, 231, 272, 281, 361
Inhibitori necompetitivi.....230, 231
Inhibitorul caii extrinseci (EPI).....278
Inhibitorul proteinei Z (PZI).....278
Inozitol 1,4,5 - trifosfat 11, 14, 99, 183, 303, 310, 311, 318, 319, 330, 331
INR.....91, 147, 274, 289, 402-404
Insertie.....86, 384
Instabilitatea microsatelitilor (MSI).....382, 394
Insuficienta renala acuta (IRA). .20-22, 147, 481, 482
Insuficienta renala cronica (IRC).....40, 86, 137, 285, 329, 433, 467, 469, 470, 482, 483
Insulina. 20, 21, 40, 42, 96-98, 106-111, 113-119, 150, 237, 281, 283, 294, 295, 301, 307, 309, 323-329, 337, 352, 353, 359, 362, 439, 441, 459, 483, 505-507, 532, 533, 537
Introni.....380, 405, 409
Ischemie miocardica.....530, 535, 537
Izoenzime.....107, 167, 233, 234, 241-243, 246, 250, 311, 442-444, 463, 517, 520, 526
Izoenzimele Amilazei.....520
Izoenzimele LDH.....234
Izoleucina.....165, 175-177, 470

J

Jod- Basedow (efect).....352

K

Ka (constanta de aciditate).....34
Kallmann (sindrom).....340
Katal.....227
KIM-1 (Kidney Injury Molecule - 1).....472
Kinaza Janus (JAK).....323, 329, 423
Kinaze ciclin-dependente (Cdk).....391, 392

L

Lactat dehidrogenaza (LDH). 101, 184, 224, 227, 233, 234, 240-248, 250, 442, 473, 486, 490, 518, 532
Lacuna anionica.....6, 31, 36
Laser Capture Microdisection - LCM.....456
LCAT (Lecitin Colesterol Acil Transferaza)..184, 240, 241
LDH4-5.....244
LDL-Colesterol.....149, 150
Legatura de hidrogen.....2, 7, 91, 179, 182, 203, 378, 417
Leucemii.....60, 248, 288, 405, 425, 480
Leucina....165, 175-177, 189, 255, 416, 470, 479
Lichid extracelular (LEC)...10, 13, 16-18, 23, 26, 28, 30, 33-35, 38, 42, 70, 241, 292, 297, 425
Lichid intracelular (LIC).....6, 10, 13
Ligaza.....385, 389, 390, 393-395, 455
Limfoame.....60, 248, 281, 405, 425, 446, 480
Limita Hayflick.....373
Lipaza.....28, 109, 116, 123, 126, 127, 129, 137, 146, 148, 240, 250-252, 312, 314, 356, 488, 489, 505, 515-517, 519, 520, 522
Lipidograma.....126, 138

Lipoproteina (a).....125, 138, 140, 148, 273, 280, 481
Lipoproteina-X.....127
Lipoproteine oxidate.....128, 139, 140, 143
Lipoproteinlipaza (LPL). .76, 116, 123, 127, 129, 130, 135, 137, 138, 146, 147, 184, 532, 533
Lipotropina.....334, 440
Litiaza. 31, 66, 146, 250, 251, 430, 436, 469-471, 473, 478, 483, 484, 489
Litiaza biliara.....146, 430, 489
Lizina 57, 125, 163, 168, 273, 280-282, 343, 414, 465
LPL.....127
LRP (LDL Receptor Related Protein) ...127, 129, 130
Lundh (test).....522
Lupus Eritematos Diseminat (LED).....197, 198, 479

M

Macroamilazemie.....251, 520
Macroelemente.....1
Macrofage.....58, 60-62, 86, 128, 131, 139, 140, 142, 143, 184, 190, 192, 193, 241, 272, 273, 281, 284, 460, 490
Macroglobulinemia Waldenström.....197, 199
Magneziu (Mg^{2+}).....23, 25, 28-32, 86, 148, 229, 361, 377, 479, 492
Malabsorbtie....27, 30, 69, 75, 79, 80, 86, 88, 89, 189, 285, 438, 489, 510, 511, 513-516, 518, 519
Malnutritie.....69, 91, 189, 206, 207, 326, 518
MAPK (mitogen-activated protein kinase)....373, 423
Matrice nucleara.....370
Melanomul malign.....446, 453
Melatonina.....174, 335, 366
Meromiozina grea.....526, 527
Meromiozina usoara.....526
Meta-dinitro-benzenul (mDNB).....105
Metastaze osoase.....31, 249
Methemoglobina.....48, 49, 53, 496
Metionina.....80, 165, 167-170, 172
Metoda Ivy.....268
MicroARN (miARN).....397, 407, 408, 417
Microelemente.....1, 138
Mielom multiplu...24, 26, 79, 197-200, 208, 249, 424, 444, 446, 453, 454, 471, 480, 520
Miocard hibernant.....537, 538
Mioglobina.....45-47, 58, 182, 246, 531
Mioglobinurie.....473
Monoiodtirozina.....173, 351

N

NAD^+. 71, 75, 101, 104, 133, 163, 166, 174, 228, 532
$NADP^+$.....75, 105, 163, 228
Natriu (Na+, Sodiu).....5, 6, 10-17, 19, 20, 22, 37, 38, 42, 56, 70, 71, 117, 118, 145, 203, 204, 268, 323, 343, 345, 347, 350, 351, 463, 466, 479, 488, 492
Natrium-iodide symporter (NIS) 350-352
Nefelometria.....218
Nefrotic (sindrom). 136, 137, 192, 198, 199, 207, 267, 274, 277-279, 285, 288, 445, 478-481
Neoplazia endocrina multipla (MEN).....438, 439
Neuroblastom.....60, 437, 443
Nick-translation.....385
Nivele de organizare a cromatinei.....370
NSE (enolaza neuron specifica).....442, 443, 451, 453
Nucleotide.....298, 300, 306, 307, 313, 319, 320, 369, 372, 375-377, 380, 381, 385, 388, 390, 392-395, 398-403, 407, 409, 417
Nucleozide.....376, 377, 410
Nucleozomi.....369-371, 385, 391, 404

O

Obezitate 114, 136, 138, 139, 141, 144, 145, 149, 267, 288, 289, 489, 511
Oligoelemente.....1, 229, 487
Oncogena bcl.....392
Oncogene.....294, 392, 421, 423, 424, 432
Ornitina.....164, 168, 175
Osmolalitate.....8, 13, 17, 20, 22, 343, 346, 347
Osmolaritate.....7, 9-17, 117, 118, 343, 345, 346, 441, 459, 461, 466, 467, 471, 482, 483
Osteoblaste.....23, 25, 26, 29, 30, 249
Osteoclaste.....23, 25-27, 29, 30
Osteomalacie.....27, 29, 30, 32, 86, 87, 239, 470, 499, 510
Osteoporoza.....29-31, 86, 87, 239, 249, 340, 499
Primara.....30
Osteoprotegerina.....25
Oxidoreducere.....72, 228, 229
Oxigenarea hemoglobinei.....37, 46, 47
Oxihemoglobina.....37, 48
Oxitocina...81, 321, 328, 341, 342, 345, 348, 349

P

P/CAF.....404, 405, 416
P53.....373, 374, 422
PAI-1.....139, 264, 281, 283, 285, 286, 288
PAI-2.....281, 284

PAI-3.....281
Pancreatita
Acuta...28, 148, 193, 250, 251, 517, 518, 520, 521
Cronica.....115, 251, 515, 517-519, 521
Paradoxul oxigenului.....539
Paraproteine.....197-200, 218
Parathormon (PTH) 25-32, 85, 86, 359, 361, 365, 367, 439, 441, 459, 482, 483
PDGF (platelet-derived growth factor). 143, 262, 284, 294, 295, 422
Pepsina.....192, 227, 235, 505, 508
Pepsinogen.....235, 240, 241, 504-506, 508
Peptid C.....109
Peptid natriuretic de tip B (BNP).....13, 433
Peptid Natriuretic de tip C (CNP).....13
Peptidul Inhibitor Gastric (GIP).....109, 505, 506
Perete vascular 140, 142, 143, 259-261, 263, 266, 273, 284, 285
Peroxidaza.....168, 314, 349, 351, 362, 516
Piurie.....472, 473, 475, 479, 484
PIVKA.....270, 278, 286, 289, 430, 490
PKa.....34-37, 47, 98, 99
Plachete sangvine...259, 261, 262, 265, 267, 268, 270, 271, 273, 278, 281, 284, 285
Plasmina 191, 192, 226, 235, 260, 271, 276, 280-283, 286
Plasminogen...140, 191, 235, 258, 264, 280-283, 285, 290, 481
Plasmocitom.....197
Porfirie.....49-51, 66
PPAR (Peroxizome Proliferator-Activated Receptors).....534
Precursori inactivi.....234
Presiune coloid-osmotica..8, 9, 64, 184, 185, 199
Presiune hidrostatica.....7-11, 17, 467, 482
Presiunea efectiva de filtrare (PEF)....9, 462, 464
Primaza.....386-388
Primer.....97, 372, 385
Primozom.....387
Proba formarii acidului hipuric.....492
Procalcitonina (pCT).....193
Prohormon convertaze.....334
Prolactina.....26, 321, 327-329, 363, 439
Prolina.....128, 156, 158, 165, 175, 406
Proopiomelanocortina.....334-336
Prostaciclin sintetaza.....263
Prostaciclina.....148, 263, 304, 314
Proteaze serinice dependente de vitamina K. 225, 269
Proteina 22 a matrixului nuclear.....436, 453
Proteina C. .81, 95, 185, 192, 199, 259, 269, 272, 278, 279, 282, 283, 285, 288, 481, 518
Proteina C activata (APC).....272, 278, 279
Proteina C reactiva.....81, 95, 185, 189, 192, 209, 269, 481, 518
Proteina S.....259, 278, 279, 285
Proteina S-100.....446, 453
Proteina Z (PZ).....278
Proteine de faza acuta.....60, 191, 192, 205, 206, 272, 433, 486
Proteine de soc termic(HSP, heat-shock protein) 386
Proteine G....11, 99, 236, 297-300, 305, 307-310, 315, 317, 318, 331, 336, 339, 344, 348
Proteine plasmatice 35, 43, 49, 95, 147, 179, 183-185, 188, 189, 191, 197, 280, 300, 353-355, 463, 486, 491, 502
Proteinkinaza A 14, 299, 304, 306, 307, 312, 314, 528
Proteinkinaza C.....97-99, 305, 311-314, 330
Proteinkinaze.....235, 304-306, 309, 311, 312
Proteinorahia.....185
Proteinorahie.....185
Proteinurie 21, 184, 185, 188, 189, 197-199, 207, 424, 471, 472, 479-484
Mixta 472
Tubulara 472
Prerenala.....184, 188
Proteinurie Bence-Jones..197-200, 424, 453, 472
Proteoliza limitata...225, 234, 235, 269, 270, 273
Proteom.....182, 454, 455
Proteomica.....424, 454, 455
Protoni. .11, 19, 20, 23, 33, 34, 36-40, 43, 45, 47, 104, 107, 117, 118, 157, 182, 228, 295, 507, 535
Protrombina. 88, 89, 91, 185, 225, 229, 235, 240, 259, 269, 270, 272, 274, 276, 279, 286-289, 430, 486, 510
PSA (antigen specific prostatei).....250, 424, 425, 433, 434, 442, 450, 451, 453
Pseudocolinesteraza.....485
Pseudohipoparatiroidism.....28
Punct crioscopic.....8, 10
Punct ebulioscopic.....8
Purpura.....265, 279

R

RAA (sistemul Renina-Angiotensina-Aldosteron).....146, 459, 463, 481
Radicali liberi...51, 143, 145, 194, 393, 395, 538, 539

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rahitism.....27, 29, 30, 69, 86, 87, 91, 239, 249, 470, 510
Rata filtrarii glomerulare (RFG)....323, 445, 463, 464, 467-469, 471, 472, 482, 483
Raynaud (sindrom).....197
Reactie osteoblastica.....249
Receptori Scavenger.....128, 129
Receptorul 2 al factorului de crestere epidermic (Human Epidermal growth-factor Receptor 2) 432
Receptorul activÄfrii proliferatorului peroxizomilor (PPAR).....128, 147
Receptorul activarii proliferatorului peroxizomilor (PPAR).....128, 534
Receptorul celular al transferinei (CD 71).....190
Receptorul endotelial al proteinei C (EPCR)..278
Receptorul LDL.....127-129, 132, 151
Reglarea activitatii enzimatice.....234
Renina.....11-13, 15, 19, 271, 323, 343, 459, 462-464, 505
Replicon.....389
Replizom.....387
Represie...28, 185, 236, 352, 370, 412, 414, 417, 423
Retinoblastom.....391
Retropozoni.....381, 384
Rh 64, 65
Ristocetin cofactor.....267, 269
Ristocetina.....267-269
ROC (curbe).....449
RXR (Retinoid X Receptor). .132, 147, 352, 354, 534

S

Salting out.....181
Sarcoame osteolitice.....249
Saruri biliare.....132, 168, 487, 489
SCC (Antigenul celulelor carcinomatoase scuamoase).....435, 457
Schilling (test).....79, 90, 505, 515
Scorbut.....69, 81, 82, 91, 172
Secretina 129, 252, 505, 506, 508, 517, 519, 521, 522
Sediment neorganizat.....478
Sedimentul urinar neorganizat.....478
Sedimentul urinar organizat.....473
Selectivitate.....212, 213, 301, 308, 472
Serina.....48, 94, 97, 98, 101, 128, 165, 166, 168, 169, 185, 225, 235, 269, 298, 304, 306, 309, 311, 312, 314, 317, 327, 404, 406, 433, 455, 528
Serotonina (5 hidroxi triptamina).....75, 81, 143, 171, 174, 252, 254, 255, 260, 263, 296, 304, 310, 438, 504
Sindroame hemoragipare.....265
Sindroamele carcinoide....75, 174, 254, 425, 438
Sindrom Crigler-Najjar.....498, 500
Sindrom mielodisplazic.....246, 444
Sindrom Rotor.....499
Sindrom Segawa.....254
Sindromul de secretie inadecvata de ADH (SIADH).....345
Sindromul Rubinstein-Taybi.....405
Sindromul X fragil.....382
Sistem al oxidoreductazelor microsomale cu functii mixte 239
Sistem microsomal de hidroxilare a medicamentelor.....239
Sistem reticulo-endotelial (SRE).....62, 132, 191, 490, 493, 496
Sistemul de grup sanguin ABO.....94
Sistemul HDL.....131
Small interfering (siARN).....407, 417
Somatoliberina.....322, 324, 325, 327
Somatostatina..310, 324, 327, 330, 359, 505, 506
Specificitate.....94, 123, 158, 191, 193, 195, 215, 220, 225, 226, 242, 291, 299-301, 305, 307, 309, 317, 318, 326, 327, 333, 334, 337, 338, 362-364, 366, 385, 424, 425, 428, 430, 431, 433-436, 442, 445, 447-449, 451, 453, 490, 491, 514-516, 520, 522, 535
STAT (signal transducers and activators of transcription).....323, 329, 423
Statine.....76, 146, 147, 149, 150
Steatoree.....514, 515, 518
Stercobilina.....63, 493
Streptokinaza.....281
Sulfhemoglobina.....49

T

Talasemie.....53-58, 62, 407, 445
Tampon (sistem).....34-36, 39, 40, 48, 201, 459
Tehnica microdisectiei tisulare.....455, 456
Telomeraze.....371, 374
Telomeri.....371, 372, 374, 375
TERC (telomerase RNA component).....374
TERT (telomerase reverse transcriptase).....374
Test de toleranta la glucoza orala (TTOG).....115
Test Stypven.....274
Teste de agregare plachetara.....268
Tetrahidrobiopterina (BH4).....253
TGF (transforming growth factor)...26, 284, 328, 339, 351

Thyroxine binding globulin (TBG) 353-357
Timidin-kinaza (TK).....401, 415, 443, 444
Timp de înjumatatire (T/2).....241
Timp de ocluzie.....268
Timp de reptilaza.....275
Timp de sângerare.....265, 268, 276
Timp de trombina.....275, 276
Timp de tromboplastina partial activata (APTT) 267, 274
Timp Quick.....274
Tireoglobulina.....332, 349-351, 360, 445
Tireoliberina (TRH)310, 328, 330-332, 334, 340, 354
Tireotoxicoza.....26, 27, 30, 332, 352, 353, 356, 362, 363
Tiroglobulina.....173, 332, 349-351, 360, 445
Tiroida.....31, 172, 173, 332, 349, 351-353, 359, 445, 451
Tiroxina...111, 172, 173, 185, 240, 289, 331-334, 351-356, 363, 366, 445
Thyroxine binding prealbumin.....353
Tiroxina libera (fT4)...331, 333, 353-357, 363
Tiroxina totala (TT4).....333, 353-357
Tirozina.....53, 97, 159, 165, 170-173, 226, 294, 312, 317, 351, 360, 437, 455, 472, 479
Tirozinemia.....51, 172
Tirozinhidroxilaza (TH).....253, 254
Tomografia prin emisie de pozitroni (PET)...535, 538
Tonicitate.....8
Topoizomeraza.....385, 390
TPA (Antigen polipeptidic tisular).435, 436, 444, 450, 453
Transaminare.....157, 163, 164, 168, 175, 464
Transaminaza. 101, 163, 199, 224, 246, 501, 502, 518
Transferina. 53, 59-61, 65-67, 185, 190-192, 194, 199, 200, 207, 209, 418, 471, 472, 481, 490, 491
Transpozoni.....384
Transtiretina.....353, 356
Transudat.....185
Treonina...97, 101, 109, 128, 165, 168, 185, 235, 298, 304, 306, 309, 311, 312, 317, 327, 404, 433, 455
TREX (transcriptie-export).....405
Trigliceride76, 105, 106, 110, 111, 116, 121-123, 126, 127, 129, 132, 134, 135, 138, 149, 227, 240, 295, 304, 315, 352, 481, 486, 488, 491, 509, 512, 514, 515, 517, 531, 532
Triiodtironina.172, 173, 331, 332, 334, 351, 353-356
Triiodtironina libera (fT3).....354-357, 363
Triiodtironina totala (TT3).....354-357
Triptofan....74, 75, 173, 174, 189, 236, 252, 438, 493
Trombocitemii.....250, 265
Trombocitopatii.....265
Trombocitopenie.....265, 285-287
Trombomodulina 259, 266, 270, 278, 282
Tromboplastina tisulara.....269
Trombopoetina.....262
Tromboxanul A2.....260, 263, 316
Tropomiozina.....246, 527-530
Tropomodulina.....530
Troponina C.....23, 527-529
Troponina I.....528
Troponina T.....246, 528, 536
Tub contort distal (TCD).....11, 19, 37, 344, 460-463, 466, 467, 471
Tub contort proximal (TCP)....11, 13, 19, 25, 37, 459, 460, 462, 465, 466, 470-472
Turbidimetria.....218

U

UMP (uridin monofosfat).....377
Unitate enzimatica (U).....226
Uree.....8, 13, 20-22, 34, 56, 101, 117, 118, 150, 157, 159, 162-165, 182, 199, 200, 232, 273, 275, 285, 343, 459, 461-464, 467-469, 472, 481-483, 486, 518
Plasmatica.....468, 482
Urinara.....482
Urobilinogen.....57, 63, 66, 479, 493, 494
Urokinaza (u-PA).....281

V

Valina.....46, 48, 52, 57, 156, 165, 175-177, 470
Valoarea cut off.....434, 449
Vasoconstrictie.....259, 260, 312, 437, 463, 482
Vitamere.....69, 77, 79, 84, 87, 88
Vitamina A.....82-84, 88, 89, 293, 513
Vitamina B1.....70-73, 90, 228
Vitamina B1260, 69, 70, 74, 77-80, 90, 170, 176, 177, 229, 246, 487, 504, 505, 507, 510, 511, 515, 516
Vitamina B5.....70, 76, 229
Vitamina B6..70, 73, 74, 163, 169, 174, 228, 229
Vitamina B8.....70, 77
Vitamina C....49, 61, 70, 80-82, 84, 91, 140, 172, 249, 460, 479
Vitamina D..25-30, 32, 84-87, 91, 121, 132, 239, 249, 292, 459, 481, 483, 486, 499, 510

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina E.....87, 88, 140, 148
Vitamina K. 88-91, 199, 225, 230, 259, 269, 270, 278, 279, 283-286, 289, 361, 430, 490, 499, 510
Vitamina M.....79
Vitamina PP. 70, 75, 76, 147, 148, 174, 228, 266, 272, 280, 470
VLDL. 76, 116, 123-132, 134-138, 146-148, 174, 486, 491
Von Willebrand 259, 261-263, 266-269, 272, 273, 275, 283-288, 290

W

Wolff Chaickoff (efect).....352

X

Xantomatoza.....135, 136, 149
Xeroderma pigmentosum (XP).....395
Xiloza.....509, 513, 516

Z

Zaharoza.....93, 95
Zimogeni.....225, 234, 235, 259, 269
Zollinger-Ellison (sindrom).....506, 507, 517
Zone alosterice.....225

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biochimie clinică. Implicații practice. Ediția a II-a
Sub redacția Minodora Dobreanu
ISBN 978-973-39-0698-8

Număr total de pagini: 579
Număr total de tabele: 109
Număr total de figuri: 292

Editura Medicală
Bulevardul Pache Protopopescu, Nr. 131, Sector 2, București

Anul 2010

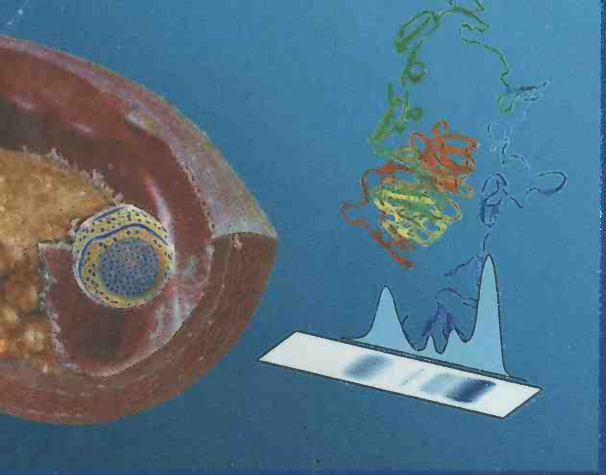
Date de contact ale autorului:
Minodora Dobreanu, tel. 0744 201611, email: dobreanum@yahoo.com

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
2010/4317
80

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Biochimie clinică

Implicaţii practice

Ediţia a II-a

Această lucrare oferă o paletă complexă de informaţii recente din biochimia clinică, cu aportul unor specialişti de renume în domeniu. Din sala de curs în laboratorul de analize medicale, veţi primi date care să vă confere cunoştinţe teoretice solide, aplicabile în practică. Explicaţiile clare şi maniera prietenoasă de prezentare a materialului (fără exces de formule chimice) vor face din această lucrare un material de referinţă pentru specialiştii din laboratorul de analize medicale.

Noutăţi în această ediţie:

- Capitole noi: hemoproteine şi metabolismul hemului, aminoacizii (structură, clasificare, metabolism), metode de explorare în laborator a proteinelor, receptorii celulari şi mecanismele de transducţie a semnalului, mecanisme de acţiune hormonală, hormonii hipotalamo-hipofizari şi tiroidieni, ADN (organizare, replicare şi reparare), ARN (transcriere, prelucrare şi reglarea exprimării genice);
- Ilustraţiile numeroase îmbogăţesc textul şi îl susţin cu succes;
- Prezentări de caz.

TOP DIAGNOSTICS
www.topdiag.com

ISBN 978-973-39-0698-8